

Osteokondroosin etiologia koiralla – kirjallisuuskatsaus

Lisensiaatin tutkielma

Caroliina Eskelinen

2018

Pieneläinkirurgia

Kliininen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Helsingin yliopisto

Tiivistelmä

Tiedekunta - Fakultet – Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Kliininen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare – Author Karoliina Eskelinen			
Työn nimi - Arbetets titel – Title Osteokondroosin etiologia koiralla – kirjallisuuskatsaus			
Oppiaine - Läroämne – Subject Pieneläinkirurgia			
Työn laji - Arbetets art – Level Lisensiaatin tutkielma		Aika - Datum - Month and year 31.05.2018	Sivumäärä - Sidoantal - Number of page 54
<p>Tämä lisensiaatin tutkielma on kirjallisuuskatsaus, jossa pyritään kokoamaan yhteen tietoa osteokondroosin etiologiasta mahdollista jatkotutkimusta varten. Tutkielmassa painotus on ravinnon vaikutuksessa luuston kehitykseen ja merkitykseen osteokondroosin puhkeamiselle.</p> <p>Osteokondroosi on useilla nisäkkäillä esiintyvä endokondraalisen luutumisen häiriö ja/tai viivästymä, josta varhaisimmat maininnat kirjallisuudessa ulottuvat 1800-luvun loppupuolelle. Endokondraalisessa luutumisessa muun muassa pitkät putkiluut, kylkiluut ja selkärangan nikamat kasvavat ja luutuvat rustoisen välivaiheen kautta rustomalleihin muodostuvien luutumiskeskusten välityksellä. Osteokondroosimuutokset voivat ilmetä niin kasvulevyjen kasvurustoilla kuin kasvurustoilla pitkien putkiluiden nivelrustojen alla. Näin ollen osteokondroosin ajatellaan ilmenevän vain kasvun aikana. Osteokondroosille tyypilliset muutokset esiintyvät paikallisesti yleensä symmetrisesti ja bilateraalisesti raajoissa. Osteokondroosi jaotellaan kolmeen muotoon riippuen endokondraalisen luutumisen viivästymisen tai häiriön laajuudesta. Lievimessä <i>latens</i> -muodossa havaitaan kasvurustossa mikroskooppisesti selvärajaisia nekroottisia alueita. Muutoksien ajatellaan ilmenevän jo varhain, mahdollisesti jo ennen syntymää, ja ne esiintyvät ennen kasvulevyä. Varhaiset osteokondroosimuutokset voivat joko parantua täysin tai kehittyä ja laajentua vakavimmiksi. <i>Manifesta</i> -muodossa muutokset ovat laajemmat, ja ne ovat havaittavissa makroskooppisesti ja röntgenkuvin. Osteokondroosin vakavimmassa <i>osteochondritis dissecans</i> -muodossa makroskooppiset muutokset yltyvät nivelruston ja sen alaisen luun väliseen liitokseen asti, jolloin joissakin tapauksissa nekrotisoitunut nivelrusto irtoaa osittain tai kokonaan. Tällöin nivelruston alainen luu paljastuu, mikä puolestaan aiheuttaa nivelessä kivuliaan steriilin tulehdusreaktion. Vakavin muoto havaitaan ajoittaisena, etenkin levon jälkeisenä ontumisena, joka voi olla vaikeaa havaita muutosten esiintyessä bilateraalisesti. Osteokondroosin vakavimmille <i>manifesta</i>- ja <i>dissecans</i>-muodoille on tunnusomaista paikallinen kasvuruston säilyminen ja paksuuntuminen, koska ruston mineralisoituminen ja sitä kautta ruston muuntuminen luuksi on estynyt. Osteokondroosin patofysiologian uskotaan kaikilla nisäkkäillä olevan sama. Nykytiedon mukaan, ainakin sioilla ja hevosilla, muutoksien taustalla tiedetään olevan kehittyvän verisuonituksen paikallinen kuolioituminen. Osteokondroosin etiologia on edelleen tuntematon. Etiologian ajatellaan olevan monisyinen, ja taustalla ajatellaan olevan geneettistä alttiutta, nopeakasvuisuutta, muutokselle altistavaa anatomista rakennetta ja toistuvaa mikrotraumaa. Myös ravinnon osuutta ajatellaan yhtenä tekijänä.</p> <p>Endokondraalisen luutumisen ja siihen vaikuttavien tekijöiden ymmärtäminen on olennaista, jotta olisi mahdollista ymmärtää osteokondroosia sairautena. Yksilössä endokondraaliseen luutumiseen vaikuttavat niin monet hormonit, kasvuruston solujen erittämät kudoshormonit kuin rustokudoksen soluväliaine. Lisäksi yksilön luuston kehitykseen vaikuttavat ulkoiset tekijät aina sikiöaikaisista maternaalisista tekijöistä siihen saakka, kun kasvulevyt kasvun lopulla sulkeutuvat. Kirjallisuuden perusteella monilla pääravintoaineilla, kivennäisillä sekä vitamiineilla on vaikutuksia yksin ja yhdessä kehittyvään luustoon, mutta myös olosuhteet ruuansulatuskanavassa vaikuttavat esimerkiksi ravintoaineiden imeytymiseen. Niin luustonkehitys kuin ravintoaineiden vaikutus siihen muodostavat monitahoisen ja toisiinsa vaikuttavan verkoston, jonka ymmärtäminen vaatii vielä lisää tutkimusta ja tutkitun tiedon yhdistelemistä.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords osteokondroosi, <i>osteochondrosis</i> , <i>osteochondritis dissecans</i> , koira, etiologia, ravinto			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktor och ledare - Director and Supervisor(s) Outi Vapaavuori ja Anna Hielm-Björkman			

Sisällys

Tiivistelmä.....	1
Johdanto	3
Kirjallisuuskatsaus	4
1 Luustonkehitys endokondraalisen luutumisen kautta nisäkkäillä	4
1.1 Rustokudoksen soluväliaine	5
1.2 Ruston muuntuminen luuksi kasvun aikana	7
1.2.1 Kasvulevyn vyöhykkeet	8
1.2.2 Rustokudoksen rustokanavat ja vaskularisaatio	9
1.2.3 Kasvulevyjen sulkeutuminen.....	11
1.3 Endokondraalista luutumista säätelevät tekijät.....	12
1.3.1 Systemiset tekijät.....	12
1.3.2 Paikalliset tekijät	14
1.3.3 Ulkoiset tekijät	16
2 Osteokondroosi.....	17
2.1 Monisyinen etiologia.....	22
2.1.1 Perinnöllisyys, anatomisesti altistavat rakenteet ja vaskulaariset tekijät.....	22
2.1.2 Ravinnon vaikutus koiran osteokondroosin kehittymiselle.....	24
2.1.2.1 Aminohapot.....	25
2.1.2.2 Vitamiinit ja kivennäisaineet.....	26
2.1.2.2.1 Rasvaliukoiset vitamiinit	27
2.1.2.2.2 Vesiliukoiset vitamiinit	29
2.1.2.2.3 Makrokivennäiset	31
2.1.2.2.4 Mikrokipennäiset eli hivenaineet.....	33
3 Pohdinta.....	35
Lähteet.....	39

Johdanto

Osteokondroosi on endokondraalisen luutumisen häiriö. Katsauksessaan Olstad ym. (2015) toteaa sairauden epidemiologian koiralla olevan vielä epäselvä, vaikkakin nykyisin vaurion tiedetään sioilla ja hevosilla johtuvan mineralisoituneeseen rustoon tunkeutuvan verisuonituksen epäonnistumisesta ja paikallisesta nekroosista. Jotta pystyy ymmärtämään osteokondroosin etiologiaa, on luuston kehittymisen ja kasvun sekä sen mahdollistavan endokondraalisen luutumisen ymmärtäminen olennaisen tärkeää. Näistä varsin monimutkaisista tapahtumasarjoista ei vielä kuitenkaan ymmärretä läheskään kaikkea, joten aihepiirin ympärillä riittää yhä paljon tutkittavaa sekä tutkitun tiedon yhdistelemistä.

Kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan ensimmäiseksi luuston kehittymistä endokondraalisen luutumisen kautta. Tämän jälkeen kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan itse sairautta, osteokondroosia ja sen puhkeamiseen vaikuttavia tekijöitä. Koska luustonkehitystä ja osteokondroosia ei ole kovinkaan paljoa yksinomaan koiralla tutkittua tietoa, on katsaukseen otettu myös mukaan muista nisäkäslajeista saatua tietoa laajemman ja tarkemman kokonaiskuvan saamiseksi. Asiayhteydessä mainitaan tietoon liittyvä eläinlaji. Kirjallisuuskatsaus painottuu ravinnon osuuteen osteokondroosin etiologiassa, joten kirjallisuuskatsauksen lopussa on lyhyesti koottuna eri ravintoaineet, joiden kirjallisuudessa on mainittu osallistuvan endokondraaliseen luutumiseen ja sitä kautta mahdollisesti sairauden ilmenemiseen. Tekstiin on koottu asiayhteyksiin olennaisten termien englanninkielistä sanastoa, jotta lukijan olisi helpottamaan lukea aihepiirin englanninkielisiä artikkeleita ja oppikirjoja.

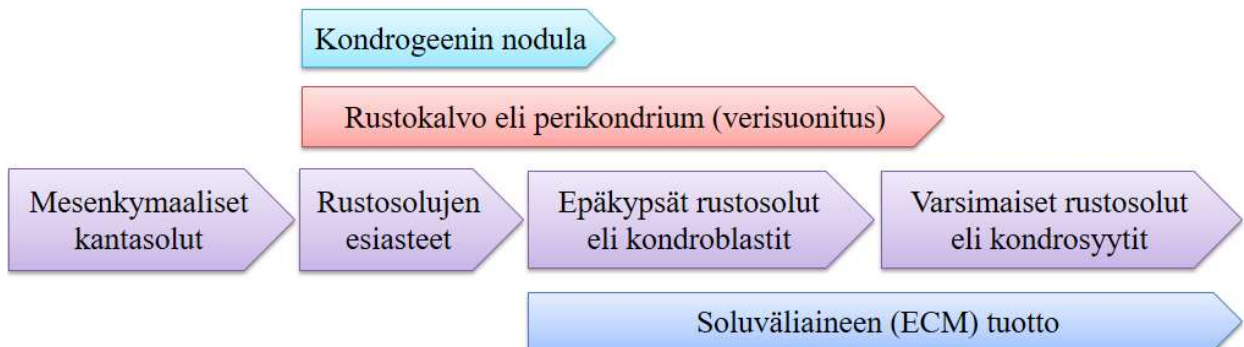
Tutkielmani tavoitteena on koota yhteen tietoa luuston kehittymisestä sekä osteokondroosista ja sen puhkeamiseen mahdollisesti vaikuttavista tekijöistä mahdollista jatkotutkimusta varten.

Kirjallisuuskatsaus

1 Luustonkehitys endokondraalisen luutumisen kautta nisäkkäillä

Nisäkkäillä lähinnä **hyaliinirusto** muodostaa endokondraalisten luiden sikiöaikaiset esiasteet (kirjassa Hall 2015, kirjassa Ross & Wojciech 2011). Muita rustotyyppejä ovat **fibroottinen syyrusto** nivelrustoissa, nivelten sisäisissä rustoissa sekä ligamenttien ja jänteiden kiinnitysmiskohdissa sekä **elastinen kimmorusto** korvanlehdissä, nielussa, kurkunkannessa ja välilevyissä (Hall 2015, Ross & Wojciech 2011).

Nisäkkäillä yksilön kehityksen aikana luut muodostuvat joko suoraan sidekudoksesta luutumalla **intramembranoottisesti** (*membrane bone*) tai epäsuorasti hyalinirustoisen välivaiheen kautta **endokondraalisesti** luutuen (*endochondral bone*) (Hall 2015, katsauksessa Mackie ym. 2011, Ross & Wojciech 2011). Endokondraalisen luutumisen kautta muodostuvat luut saavat alkunsa **kondrogeenesissä** (kuva 1). Monet rustot ovat mesodermaalista alkuperää ja ne muodostavat **endokondraalisen luuston** (*endoskeleton*), joka käsittää raajat ja selkärangan nikamat (Hall 2015).



Kuva 1. Kondrogeenesi eli rustokudoksen muodostuminen. Endokondraalisen luutumisen kautta muodostuvat luut saavat alkunsa mesenkymaalisista kantasoluista, jotka muuntuvat rustosolujen esiasteiksi. Kondrogeenesissä rustosolujen esiastesolut alkavat kerääntyä yhteen muodostaen kondrogeenisen nodulan, missä ne muuntuvat epäkypsiksi rustosoluiksi eli kondroblasteiksi, jotka alkavat tuottaa ulkopuolelleen soluväliainetta. Soluväliaineen vähitellen erottamat kondroblastit kypsyvät varsinaisiksi rustosoluiksi, kondrosyyteiksi. Kondrogeenisen nodulan ympärille muodostuu tiiviistä sidekudoksesta oleva rustokalvo eli perikondrium, jossa on verisuonitus ja jonka sisemmässä osassa muodostuu uusia rustosoluja (Mackie ym. 2011, Ross & Wojciech 2011).

Rustokudos voi kasvaa kahdella tavalla; joko niin sanottuna **päällyskasvuna** (*appositional growth*) tai **sisäisenä kasvuna** (*interstitial growth*) (Hall 2015). Näistä ensin mainitussa uutta rustoa muodostuu vanhan ruston päälle, kun rustokalvon sisemmässä kerroksessa olevat fibroblastimaiset solut muuntuvat ensin kondroblasteiksi ja siitä kondrosyyteiksi tuottaen samalla uutta soluväliainetta. Sisäisessä kasvussa rustokudoksessa olevat kondroblastit ja -syytit jakaantuvat 'lacunoiksi' kutsutuissa koteloissaan samalla tuottaen soluväliainetta. Endokondraalisen luutumisen aloittavassa hyaliniirustoisessa mallissa on havaittavissa molempia kasvutapoja (Hall 2015, Ross & Wojciech 2011).

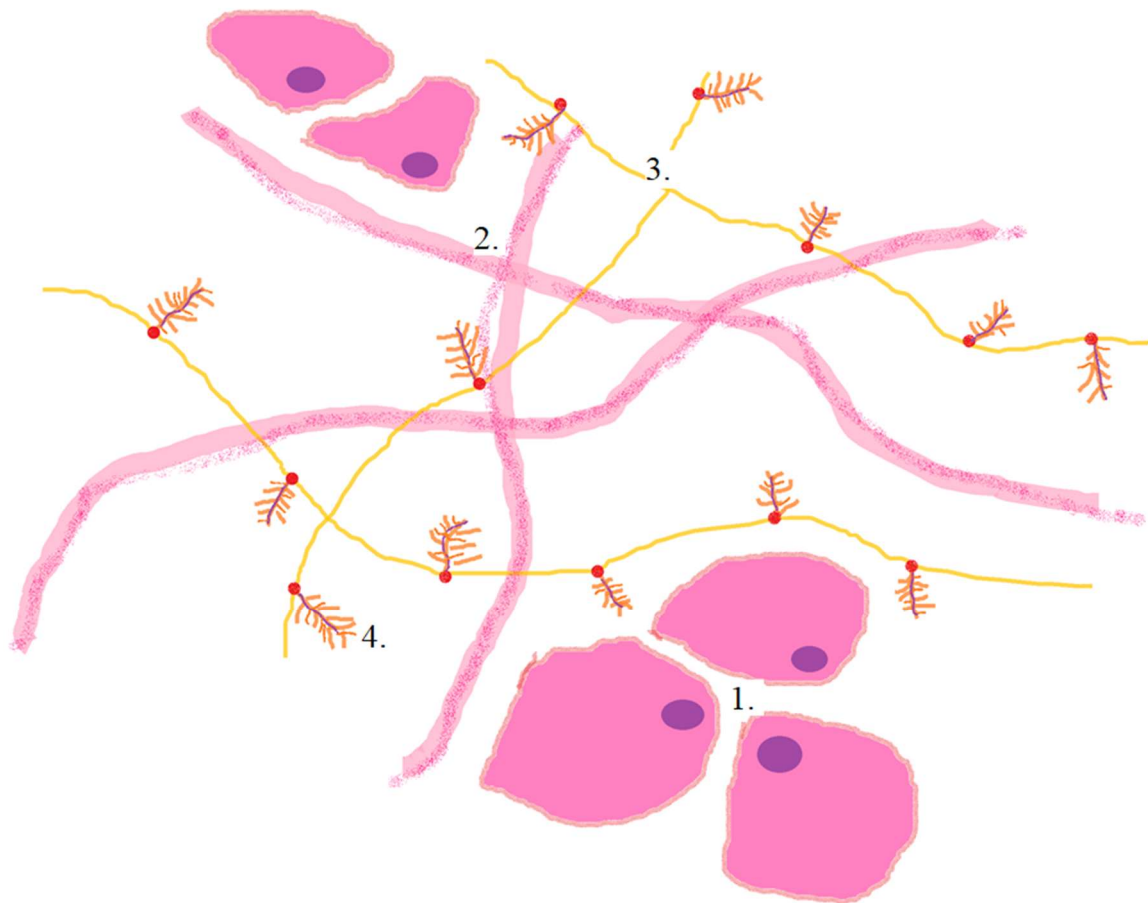
Kehittyvä luusto kasvaa niin **intramembranoottisesti** (kallon luut), **luukalvonalaisesti** (pitkien putkiluiden diafyysien paksuuntuminen) sekä **endokondraalisesti** (pitkät putkiluut, kylkiluut ja selkärangan nikamat) (Hall 2015). Endokondraalisessa luutumisessa verisuoneton rusto muuntuu verisuonelliseksi luukudokseksi (Hall 2015, Ross & Wojciech 2011). Endokondraalista luutumista tapahtuu lähinnä kasvavassa rustossa, joka itsessään on vain väliaikainen kudos luiden kehittyessä (Olstad ym. 2015, Hunziker ym. 2007).

1.1 Rustokudoksen soluväliaine

Rustokudoksen soluväliainetta muodostavat **kondroblastit** ja **kondrosyytit** (kuvan 2 kohta 1), ja vastaavasti rustokudosta hajottavat **kondroklastit** (Hall 2015). Rustokudoksessa rustosolut ovat erillään toisistaan soluväliaineen takia, jota on noin 30 prosenttia rustokudoksesta. Rustokudoksen soluväliaine koostuu kollageeneista, proteoglykaaneista ja multiadhesiivisistä glykoproteiineista (Hall 2015, Ross & Wojciech 2011). **Kollageenin** (kuvan 2 kohta 2) tehtävä on antaa rustokudokselle tukirakenne (Hall 2015). Pääasiallisin rustokudoksen soluväliaineen proteiini on tyypin II kollageeni, mutta esimerkiksi nivelrustossa, fibroottisessa syyrustossa ja sekundaarisessa rustossa tavataan myös tyypin I kollageenia (Hall 2015, Ross & Wojciech 2011). Hypertrofisessa rustossa kollageeni on tyyppiä X (Hall 2015).

Hyaliniiruston proteoglykaaniaggregaateissa on kolmen tyyppisiä, nauhamaisia **glykosaminoglykaaneja** (GAG) (kuvan 2 kohta 3), joihin liittyy proteoglykaanimonomeerejä, joista hyaluronirustolle tärkein on pitkiin nauhamasiin hyaluronihaposta koostuviin hyaluronaatteihin sadoittain sitoutuva aggregaani (kuvan 2 kohta 4). Aggregaani koostuu muiden proteoglykaanimonomeerien tapaan proteiiniytimestä, johon on kiinnittyneenä aggregaatin tapauksessa satoja lyhyitä nauhamaisia kondroitiinisulfaatteja sekä keratiinisulfaatteja. Sulfaattiryhmiensä takia aggregaani on voimakas negatiivinen varaus, mistä johtuen se sitoo voimakkaasti vettä. Ruston soluväliaineessa voi olla vettä jopa 80 prosenttia rustokudoksen

nettopainosta, mikä antaa rustolle painetta ja puristusta kestävänsä sekä diffuusion mahdollistavan rakenteen (Hall 2015, Ross & Wojciech 2011). Korkean nestepitoisuutensa ansiosta rusto on ideaalinen materiaali kasvassa luustossa ja nivelpinnoilla (Hall 2015). Aggregaanin synteesiä stimuloi puristusvoimat, jollaisia on tyypillisesti esimerkiksi nivelrustoissa (Hall 2015). Puolestaan **multiadhesiiviset glyproteiinit** osallistuvat muun muassa kondrosyyttien ja soluväliaineen välisiin vuorovaikutuksiin sekä ankkuroivat kondrosyytit soluväliaineeseen (Hall 2015, Mackie ym. 2011, Ross & Wojciech 2011). Yhdessä rustokudoksen kollageenit, proteoglykaanit ja multiadhesiiviset glykoproteiinit muodostavat keskenään vuorovaikuttavan ja kondrosyytteihin vaikuttavan monimuotoisen verkoston (Mackie ym. 2011).



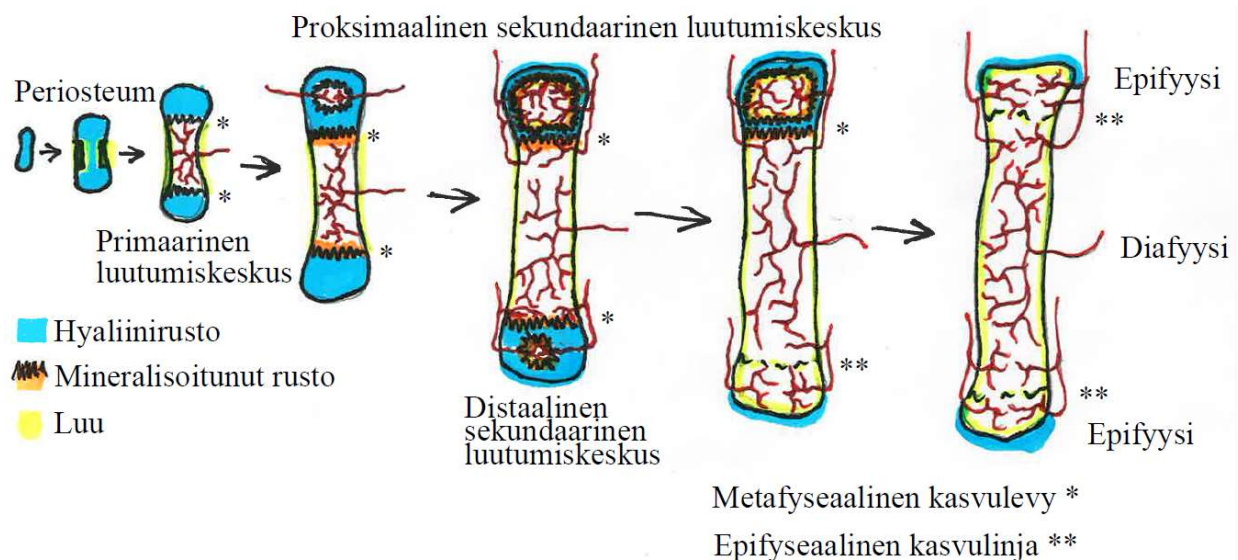
Kuva 2. Rustokudoksen histologinen rakenne kaavamaisesti esitettynä (kuva muokattu kirjan Ross & Wojciech 2011 kuvasta, s. 200).

1.2 Ruston muuntuminen luuksi kasvun aikana

Kirjallisuudessa intramembranoottinen ja endokondraalinen luutuminen käsitellään erillisinä tapahtumia, vaikkakin suurin osa pitkien luiden luutumisesta alkaa luukalvonalaisesti ja näin ollen voidaan pohjimmiltaan ajatella intramembranoottiseksi luutumiseksi (Hall 2015, Ross & Wojciech 2011).

Rustokalvon ympäröimien rustomallien luutuminen alkaa jo sikiökaudella, kun vielä rustoisen putkiluun runko-osan eli **diafyysin** pinnan keskivaiheille alkaa muodostua mesenkymaalista alkuperää olevia osteoblastien esiasteita, jotka puolestaan muuntuvat varsinaisiksi osteoblasteiksi kasvutekijöiden yhteisvaikutuksesta (Ross & Wojciech 2011, katsauksessa Mackie ym. 2008, Kronenberg 2006). Tällöin rustokalvo muuntuu luukalvoksi eli **periosteumiksi** osteoblastien muodostaessa diafyysin ympärille luisen pinnan (kuva 3). Luukalvon alla olevat kondrosyytit alkavat kasvaa kokoa eli muuttuvat hypertrofisiksi (Hall 2015, Ross & Wojciech 2011).

Hypertrofiset kondrosyytit ovat olennaisessa osassa endokondraalisen luutumisen alkuvaiheessa, jotta rustokalvo muuntuu luukalvoksi ja osteogeneesi alkaa, sekä rustokudoksen hajotuksessa (Hall 2015). Hypertrofisten kondrosyyttien erittämä kollageenityyppi vaihtuu tyypistä II tyyppiin X (Mackie ym. 2011, katsauksessa van der Eerden ym. 2003). Tyypin X kollageeni säätelee ja myötävaikuttaa rustokudoksen mineralisoitumiseen (Hall 2015, Ross & Wojciech 2011). Hypertrofiset kondrosyytit tuottavat alkaalista fosfataasi -entsyymiä, joka vapautuessaan soluväliaineeseen saa aikaan rustokudoksen mineralisaation (katsauksessa Mebarak ym. 2013, Mackie ym. 2011). Samalla soluväliaineeseen vapautuu muita entsyymejä, kuten sfingomyelinaasia ja autotaksiinia sekä kalsiumia, fosfaattia ja glykosaminoglykaaneja (Mebarak ym 2013). Hypertrofiset kondrosyytit keräävät solulimaansa glykogeeniä, koska hypertrofisen vyöhykkeen kondrosyytit säilyvät metabolisesti aktiivisina (Ross & Wojciech 2011).

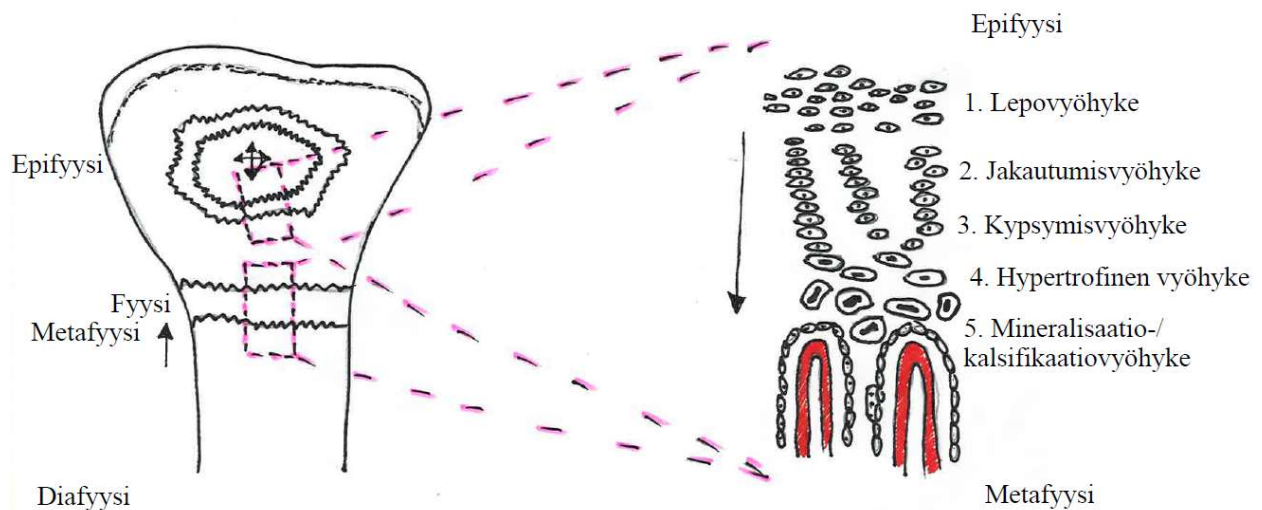


Kuva 3. Endokondraalinen luutuminen (kuva muokattu kirjan Carlson & Weisbrode 2012 kuvasta, s. 927).

1.2.1 Kasvulevyn vyöhykkeet

Ytheruksen ym. 2007 katsauksessa kerrotaan kaikissa luutumiskeskuksissa hyaliiniruston käyvän läpi solutasolla samat vaiheet muuttuessaan luukudokseksi. Kasvulevyjen rustosolusoluvaiheiden kolme vaiheittaista solupopulaatiota voidaan hahmottaa vyöhykkein, jotka esitetään kuvassa 4 (Hall 2015, Ross & Wojciech 2011).

Ensimmäinen vyöhyke on vielä lepoaiheessa olevista kondrosyyteistä koostuva **lepovyöhyke** (kuvassa 3 kohta 1), missä kudos on tavallista verisuonetonta hyaliinirustoa (Ross & Wojciech 2011, Ytrehus ym. 2007). Tämän jälkeen havaitaan nopean jakautumisen eli proliferaation aloittaneiden kondrosyyttien muodostama **jakautumisvyöhyke** (kuvassa 4 kohta 2), jossa kondrosyytit alkavat tuottaa soluväliainetta sekä alkavat järjestyä jonoihin diafyysissä ja rykelmiin epifyysissä (Mackie ym. 2011, Ross & Wojciech 2011, Ytrehus ym. 2007). Kolmannella vyöhykkeellä kondrosyytit kypsyvät aktiivisesti tuottaen ja ylläpitäen soluväliainetta (kuvassa 4 kohta 3). Vyöhykettä, jolla kondrosyytit kasvavat kokoa tuottaen ja ylläpitäen soluväliainetta, kutsutaan **hypertrofiseksi vyöhykkeeksi** (kuvassa 4 kohta 4) (Hall 2015, Mackie ym. 2011, Ross & Wojciech 2011, Ytrehus ym. 2007).



Kuva 4. Kasvulevyjen anatomiaa: Hyaliniiruston muuntuminen luuksi putkiluussa (kuva muokattu artikkelin Nap & Hazewinkel 1994 kuvasta).

Edellä mainitut neljä vyöhykettä katsotaan kuuluviksi **kasvulevyyn eli fyysiin**, jotka vastaavat pitkien luiden kasvusta (Ytrehus ym. 2007). Kasvulevyn jälkeen sijaitsee **mineralisaatiovyöhyke** (kuvassa 4 kohta 5), jossa myöhäisen vaiheen hypertrofiset kondrosyytit vapauttavat soluväliaineeseen mineralisoitumisen aikaan saavia molekyylejä (Mackie ym. 2011, Ross & Wojciech 2011).

Kasvulevyä seuraavan metafyysin katsotaan koostuvan kahdesta osasta, joista mineralisaatiovyöhykeen jälkeiselle vyöhykkeelle on tunnusomaista pystysuorat luuseinämiä ympäröivät rustoiset ytimet, jonka jälkeen edetessä kohti diafyysia voidaan havaita yllä mainittuja verisuonisilmukoita rustokanavissa (Ross & Wojciech 2011, Ytrehus ym. 2007). Tämän jälkeen mineralisoitunut rusto ja hohkaluu korvautuvat varsinaisella lamellaarisella luulla (Ross & Wojciech 2011, Ytrehus ym. 2007).

1.2.2 Rustokudoksen rustokanavat ja vaskularisaatio

Tavallinen rustokudos on verisuonetonta ja sen kondrosyytit 'vastustavat' verisuonituksen muodostumista, kun taas hypertrofinen rustokudos ja sen kondrosyytit eivät (Hall 2015, Ross & Wojciech 2011, Kaminski ym. 1977). Katsauksessaan Semevolos (2017) toteaa verisuonituksen olevan olennaisen tärkeä endokondraaliselle rustolle, koska nivelnesteestä diffuusion avulla siirtyvät ravinteet eivät käytännössä voi kulkeutua riittävän syvälle. Ja jotta varsinaista luukudosta voi muodostua sen korvauksessa mineralisoituneen kuolleen hyaliniiruston, täytyy

luukalvon läpi mineralisoituneeseen rustokudokseen tunkeutua verisuonitus (Mackie ym. 2011, Ytrehus ym. 2007, Zelzer ym. 2004, Zelzer ym. 2001).

Hiiren epifysealisessa rustossa on havaittu kolmenlaisia **rustokanavia** (*cartilage canals*); 1) ei-mineralisoituneen rustokudoksen pinnallisia rustokanavia, joissa on fibroblasteja ja makrofageja, 2) hypertrofisessa rustokudoksessa olevia välimuotoisia rustokanavia, joissa lysosomaalisia fibroblasteja, sekä 3) mineralisoituneessa rustokudoksessa olevia syviä rustokanavia, joissa on kondroklasteja (Cole & Wezeman 1985). Tiedetään, että ihmissikiöllä vielä mineralisoitumattomaan rustokudokseen muodostuneet pinnalliset rustokanavat ja niihin hetkeä myöhemmin tunkeutuvat verisuonet ovat havaittavissa pitkissä putkiluissa 12. raskausviikolla, minkä jälkeen rustokudoksen mineralisaatio tapahtuu pian (Hall 2015, Ross & Wojciech 2011).

Hypertrofiset kondrosyytit alkavat tuottaa vaskulaarisen endoteelin kasvutekijää (*a vascular endothelial growth factor, VEGF*), joka puolestaan alkaa "houkutella" muodostuvia verisuonia rustokudokseen (Mackie ym. 2011, Ross & Wojciech 2011, Zelzer ym. 2004, Zelzer ym. 2001). Rustokudoksen 'kyky vastustaa' verisuonituksen tunkeutumista katoaa samanaikaisesti rustokudoksen mineralisoitumisen kanssa, ja vastaavasti mineralisoituneen rustokudoksen soluväliaineen hajotus alkaa samanaikaisesti verisuonten tunkeutuessa rustokudokseen (Hall 2015). Lisääntyvän mineralisaation estäessä kondrosyyttien diffuusion avulla tapahtuvan aineenvaihdunnan ja kuona-aineiden poiston, alkavat hypertrofiset kondrosyytit kuoleutua **solutyypispeifisen ei-apoptoottisen mekanismin** (*cell type-specific non-apoptotic mechanism*) kautta (Mackie ym. 2011, Ross & Wojciech 2011). Myös verisuonten tunkeutuminen luukalvon läpi todennäköisesti mahdollistuu hypertrofisten rustosolujen kuoleutumisen kautta, mikä puolestaan liittyy nisäkkäillä edelle kuvattuun rustokudoksen soluväliaineen mineralisoitumiseen (Hall 2015, Boskey ym. 2001, Kaminski ym. 1977). Toisaalta verisuonituksen tunkeutuminen ruston soluväliaineeseen saa aikaan ja lisää kondrosyyttien hypertrofiaa ja tyypin X kollageenin tuotantoa (Hall 2015, Boskey ym. 2001, Kaminski ym. 1977).

Kondroklastit ja myöhemmin osteoklastit vastaavat mineralisoituneen ruston ja siinä esiintyvien poikittaisten 'väliseinien' eli septojen hajotuksesta proteolyyttisten entsyymien, kuten **matriksimetallproteinaasit** (*matrix metalloproteinases*), **katepsiinit** (*cathepsins*) ja **gelatinaasit** (*gelatinases*) avulla, jättäen jäljelle vain pystysuorat syvät rustokanavat, jotka mahdollistavat verisuonituksen kasvun rustoon (Hall 2015, Mackie ym. 2011, Ross & Wojciech 2011, Gartland ym. 2009, Ytrehus ym. 2007, Deckers ym. 2002, Saftig ym. 1998, Lee ym. 1995). Rustokanavissa kulkee myös hermoja. Lisäksi rustokanavat ovat olennaisessa osassa

ruston muodostumisessa, ylläpidossa, kasvussa ja hajottamisessa sekä sekundaaristen luutumiskeskusten muodostumisessa (Hall 2015).

Mineralisoituneeseen rustoon kulkeutuu syvien rustokanavien verisuonten kautta niin verta muodostavia eli **hematopoieettisia soluja** kuin luukudoksen esiastesoluja eli **osteoprogenitorisia soluja**, jotka saavat aikaan niin primaaristen kuin sekundaaristen luutumiskeskusten muodostumisen kasvavaan luuhun, sekä varsinaisen luunmuodostuksen mineralisoituneessa rustossa (Dirckx ym 2013, Mackie ym. 2011, Maes ym. 2010, Kugler ym. 1979). Osteoprogenitoriset solut muokkaavat mineralisoitunutta rustoa ja uutta luukudosta luiden vielä kasvaessa (Hall 2015, Ross & Wojciech 2011). Muodostunut **primaarinen luutumiskeskus** (kuva 3) etenee kohti diafyysin molemmissa päissä sijaitsevia kasvulevyjä (Mackie ym. 2011, Ross & Wojciech 2011). Diafyysien luutuminen tapahtuu kasvulevyjä lukuun ottamatta ennen syntymää, mutta syntymän aikoihin muodostuu luun päissä sijaitsevien epifyysien keskivaiheille **sekundaariset luutumiskeskukset** (kuva 3), joiden muodostuminen mahdollistuu niin ikään epifyyseiin tunkeutuvan verisuonituksen kautta (Ross & Wojciech 2011). Ensin luun proksimaali- ja sitten distaalipäähän muodostuvassa sekundaarisessa luutumiskeskuksessa luutuminen alkaa luun keskeltä saavuttaen vähitellen metafyseaaliset kasvulevyt ja hyalinirustoisien nivelruston rajapinnan (Ross & Wojciech 2011). Hieman ennen endokondraalisen luutumisen päättymistä diafyysistä tuleva verisuonitus yhtyy eli anasmotoituu epifyseaaliseen verisuonitukseen, kun primaarinen ja sekundaarinen luutumiskeskus kohtaavat. Samoin tapahtuu sekundaarisen luutumiskeskuksen kohdatessa nivelruston (katsauksessa Laverty & Girard 2013, Ytrehus ym. 2007).

1.2.3 Kasvulevyjen sulkeutuminen

Kasvun lopulla kasvulevyjen sulkeutuminen alkaa, kun kondrosyytit lopettavat jakautumisensa (Mackie ym. 2011, Ross & Wojciech 2011, Weise ym. 2001). Tällöin edellisessä luvussa kuvattu prosessi jatkuu, kunnes kasvulevyt katoavat primaarisen ja sekundaarisen luutumiskeskusten sulautuessa toisiinsa (Mackie ym. 2011, Ross & Wojciech 2011). Näin rustoisesta luun mallista on enää jäljellä kasvulevyn jäännös eli **epifyseaalinen linja** sekä hyalinirustoinen nivelpinta (Ross & Wojciech 2011).

Oletetaan, että nisäkkäillä pitkien putkiluiden kasvaminen lakkaa, kun kasvulevyn progenitoriset kondrosyytit on ikään kuin käytetty loppuun hormonaalisten tekijöiden vaikuttaessa kasvulevyjen sulkeutumiseen (Hall 2015). Ihmisellä luumassa lisääntyy puberteetin aikana, joskin sukupuolten välillä on eroja (Prenticer 2006). Ihmisillä estrogeeni säätelee kasvulevyjen

sulkeutumista oletettavasti nopeuttamalla jakautuvien kondrosyyttien vanhenemista (Mackie ym. 2011, Weise ym. 2001, Morishima ym. 1995, Smith ym. 1994). Myös koirilla on viitteitä siitä, että sukupuolihormonit vaikuttavat kasvulevyjen sulkeutumiseen sukupuolihormonien puutteen, varhaisen kastraation tai sterilaation myötä, hidastaessa kasvulevyjen sulkeutumista. Joskaan tutkimuksissa ei olla saatu tilastollisia eroja neuteroimattomien ja neuteroitujen koirien välillä (katsauksessa Kustrizt 2007, Salmeri ym. 1991).

Carlson & Weisbrode 2012 kirjassa kerrotaan myös ravitsemuksella olevan vaikutusta kasvulevyjen sulkeutumiseen, sillä esimerkiksi A-vitamiinin liikasaanti ja mangaanin puute aiheuttavat kasvulevyn soluväliaineen heikentymistä ja hajoamista, joka pahimmillaan aiheuttaa kasvulevyjen ennenaikaisen sulkeutumisen.

1.3 Endokondraalista luutumista säätelevät tekijät

Nykyään tiedetään jo melko paljon pitkien putkiluiden kasvulevyjen kondrosyyttien säätelyyn osallistuvista tekijöistä. Ihmisillä tiedetään luuston kasvuun ja kehitykseen vaikuttavan geneettiset tekijät, ja useiden geenien vaikuttavan esimerkiksi kasvuhormonin, insuliinin kaltaisen kasvutekijä 1:en (*insulin-like growth factor, IGH-1*) ja D-vitamiinireseptoreihin toimintaan (Prenticer 2006). Kaikissa endokondraalisen luutumisen vaiheissa kasvulevyjen eri vaiheissa olevien kondrosyyttien toimintaan vaikuttavat monet systeemisesti vaikuttavat hormonit, paikallisesti eritetyt kudostekijät sekä soluväliaineen eri osatekijät, joiden ilmentymistä puolestaan säätelevät useat eri geenit ja transkriptiotekijät (Hall 2015, Mackie ym. 2011). On havaittu, että rotilla ja kanoilla kasvulevyjen kasvun säätely ei pysy koko kasvun ajan samanlaisena, vaan se muuttuu etenkin syntymän jälkeen (Ohsugi ym. 1997, Hunziker & Schenk 1989). Alla on käsitelty niistä keskeisimmät tekijät pääpiirteittäin, sekä pyritty painottamaan erityisesti osteokondroosin kannalta merkittäviä tekijöitä.

1.3.1 Systeemiset tekijät

Sjaastad ym. (2010) toteaa kirjassaan yksilön koon määräytyvän luuston kasvusta, johon perinnöllisten tekijöiden ja yksilön saaman ravinnon lisäksi vaikuttavat monet hormonit. Kasvavan yksilön kehittyvän luuston kasvua ja mineralisoitumista säätelevät monet verenkierron kautta kohdekudokseen vaikuttavat tekijät, joista tärkeimpiä ovat kasvu-, kilpirauhas- ja sukupuolihormonit sekä kalsiotrooppiset hormonit parathormoni, kalsitoniini ja D-vitamiini (Hall 2015, Sjaastad ym. 2010). Vaikka D-vitamiini voidaan ajatella hormoniksi, sillä sitä tuotetaan ihossa auringon UV-valon myötävaikutuksella, saadaan D-vitamiinia myös ravinnosta

(Sjaastad ym. 2010). Käsittelen D-vitamiinia tutkielmassani ravintoaineita käsittelevässä osuudessa, koska koirien tiedetään olevan, ainakin osittain, riippuvaisia ravinnosta saatavasta D-vitamiinista (Tryfonidou ym. 2003, Hazelwinkel ja Tryfonidou 2002, Morris 1999, How ym. 1994).

Aivolisäkkeestä erittyvä **kasvuhormoni** eli somatotropiini on tärkeässä roolissa nisäkkäiden kasvurustossa saaden aikaan kondrosyyttien kypsymistä ja jakautumista pääasiassa niin maksan solujen kuin itse kondrosyyttien erittämän IGH-1:en kautta (Mackie ym. 2011, Sjaastad ym. 2010, Hunziker ym. 1994). Kokeellisesti on voitu osoittaa rotilla, että kasvuhormonin ja/tai IGF-1:n puuttuminen hidastaa luiden kasvua solutasolla (Hunziker ym. 1994). Nisäkkäillä kasvuhormonin erittymistä lisää kilpirauhas- ja sukupuolihormonien lisäksi stressi, fyysinen aktiivisuus sekä ravinnon energia- ja glukoosipitoisuus (Sjaastad ym. 2010). Plasmassa olevat ravintoaineet siis vaikuttavat kasvuhormonin erittymiseen, mutta vastaavasti kasvuhormonin määrä plasmassa vaikuttaa myös ravintoaineiden pitoisuuksiin siinä (Sjaastad ym. 2010). Vaikka kasvuhormonia erittyy myös sikiöaikana, ei kasvuhormoni osallistu nisäkäsyksilön kehitykseen vasta kun syntymän jälkeen yksilön kasvaessa (Sjaastad ym. 2010). Kasvuhormonireseptorien oletetaan lisääntyvän syntymän jälkeen, ja niitä löytyy myös luukudoksesta ja kasvulevyjen rustosta (Hall 2015).

Kilpirauhashormonit ovat tärkeitä hypertrofisten kondrosyyttien säätelijöitä sekä vaikuttavan luiden kasvuun ja mittasuhteisiin nisäkkäillä (Mackie ym. 2011, Ross & Wojciech 2011). Tyroksiini riippuen rustotyyppistä ja/tai kondrosyyttien vaiheesta kasvulevyllä saa aikaa nisäkkäillä kondrosyyttien hypertrofiaa naudalla (Alini ym. 1996). Kokeellisesti trijodityroniini ja tyroksiini on osoitettu vaikuttavan etenkin kaikista epäkypsimpiin kondrosyytteihin naudan kasvulevyllä (Alini ym. 1996). Lisäksi rotilla tyroksiini lisää rustokanavien muodostumista stimuloiden kanavien muodostumisessa olennaisessa osassa olevaa ohjelmoitua solukuolemaa (Delgado-Beaza ym. 1992). Kokeellisesti on voitu osoittaa, että nisäkkäillä tyroksiini lisää alkaalisen fosfataasin ja tyypin X kollageenin määrää sekä saa kondrosyytit järjestymään vertikaalisiin jonoihin kasvulevyillä (Ballock & Reddi 1994).

Parathormoni eli lisäkilpirauhashormoni (PTH) tuotetaan ja eritetään lisäkilpirauhasista plasman kalsium pitoisuuden laskiessa liian alas (Nap & Hazewinkel 1994). Vastaavasti PTH:n erityks lakkaa, kun plasman kalsiumpitoisuus nousee normaalille tasolle (Sjaastad ym. 2010). Parathormonin vaikutuksesta luukudosta tuottavat osteoblastit vapauttavat kalsiumia solun ulkopuolelle ja väistyvät antaen tilaa luukudosta hajottaville aktivoituneille ja lisääntyneille

osteoklasteille, jolloin kalsiumia vapautuu luukudoksesta vereen (Sjaastad ym. 2010, Nap & Hazewinkel 1994).

Kalsitoniinia eli tyrokalsitoniini tuotetaan, varastoidaan ja eritetään kilpirauhasen parafollikulaarisista C-soluista, kun plasman kalsiumpitoisuus nousee esimerkiksi kalsium pitoisen aterian jälkeen (Nap & Hazewinkel 1994). Lisäksi gastrointestinaalisten hormonien, kuten gastriinin, sekretiinin ja kolekalsiferolin, erittyminen ohutsuoleen saa aikaan kalsitoniinin erittymistä verenkiertoon (Sjaastad ym. 2010, Nap & Hazewinkel 1994). Kalsitoniinin vaikutuksesta osteoklastien aktiivisuus ja määrä vähenee, jolloin luukudoksen hajotus vähenee (Sjaastad ym. 2010, Nap & Hazewinkel 1994). Puolestaan osteoblastien aktiivisuus lisääntyy, jolloin kalsiumia sidotaan verenkierrasta luustoon (Nap & Hazewinkel 1994).

Lisäksi **sukupuolihormonit** ovat suuressa roolissa määrittäessään kasvulevyjen sulkeutumisajankohtaa (Carlson & Weisbrode 2012). Ihmisellä sukupuoleen katsomatta estrogeeni osallistuu kasvulevyjen sulkeutumiseen (Mackie ym. 2011, Weise ym. 2001, Morishima ym. 1995, Smith ym. 1994). **Glukokortikoidit** voivat aiheuttaa osteoporoosia, sillä kyseiset hormonit hidastavat luun muodostumisnopeutta ja lisäävät luukudoksen hajotusta (Sjaastad ym. 2010).

1.3.2 Paikalliset tekijät

Jotta luut kehittyvät normaalisti endokondraalisen luutumisen kautta, vaaditaan siihen useiden eri solujen erittämien paikallisten tekijöiden osallistumista (Kronenberg 2006). 2000-luvun puolella tehtyjen tutkimusten valossa näyttää siltä, että kasvulevyjen kondrosyytit säätelevät itse hyvinkin tarkasti ja hienovaraisesti ruston muuttamista luuksi, erittämällä useita liukoisia tekijöitä (Mackie ym. 2011). Alle lyhyesti koottuna muutamia näistä tekijöistä.

Kasvuhormonin tiedetään lisäävän **IGH-1:en** eritystä niin maksan soluista kuin fyysien kondrosyyteistä saaden aikaan kondrosyyttien proliferaatiota lisäten pitkien luiden kasvua (Mackie ym. 2011, katsauksessa Nap & Hazewinkel 1994). Lisäksi IGH-1 lisää yleisesti solujen jakautumista ja erilaistumista (Nilsson ym. 1986). Plasman IGH-1 konsentraatioon vaikuttaa kasvuhormonin lisäksi ravinto ja erityisesti sen proteiini- ja energiapitoisuudet. Esimerkiksi paaston on todettu laskevan plasman IGH-1 pitoisuutta (Nap & Hazewinkel 1994). Lisäksi kasvulevyn ruston on todettu erittävän IGH-1:ta niin para- kuin autokriinisesti parathormonin vaikutuksesta (Nap & Hazewinkel 1994). IGH-1:n pitoisuus on suurempi vielä kasvavilla koirilla

verrattuna aikuisiin yksilöihin, ja sillä on todettu olevan vaikutusta fosforin erittymiseen sekä kalsitriolin tuotantoon munuaisissa (Nap & Hazewinkel 1994).

Normaalille alkion kasvulle välttämätöntä **insuliinin kaltaista kasvutekijä 2:sta** (*insulin-like growth factor, IGH-2*) esiintyy kasvulevyssä itsenäisesti ilman, että kasvuhormonilla on vaikutusta sen erittymiseen (Mackie ym. 2011, DeChiara ym. 1991).

Lisäkilpirauhashormonia muistuttava proteiini (*parathyroid hormone-related protein, PTHrP*) ja **Indian hedgehog proteiini** (*Ihh protein*) osallistuvat endokondraalisen luun kehityksen säätelyyn lisäämällä kondrosyyttien proliferaatiota, mutta samalla hidastamalla kondrosyyttien hypertrofiaa (Mackie ym. 2008, Kronenberg 2006). PTHrP synteetille on välttämätöntä myöskin kondrosyyttien syntetisoiman Indian hedgehog proteiinin erittyminen (Kronenberg 2006). Endokondraalisessa luussa PTHrP:a erittää rustokalvon alaiset ja epifysealiset kondrosyytit (Kronenberg 2006). PTHrP:lla on myös paljon muita tehtäviä elimistössä, joten myös monet muut eri elimistön solut erittävät PTHrP:a (Kronenberg 2006). PTHrP aktivoi samoja reseptoreita kuin PTH (Mackie ym. 2008, Kronenberg 2006). Kilpirauhashormoneilla näyttää olevan vaikutusta PTHrP:n ja sen reseptoreiden määrään (Mackie ym. 2011, Mackie ym. 2008, Stevens ym. 2000).

Hypertrofisten kondrosyyttien on todettu erittävän **VEGF:a** ja näin saaden aikaan uuden verisuonituksen tunkeutumisen kalsifioituneeseen rustoon sekä VEGF-reseptoreiden lisääntymisen rustokalvolla, mikä puolestaan mahdollistaa veren mukana tulevien osteoprogenitoristen solujen paikalle saapumisen (Mackie ym. 2011, Ytrehus ym. 2007, Zelzer ym. 2001). Yleisesti VEGF:a tuottavat solut kärsivät hapen puutteesta, jolloin solut erittävät **hypoksian indusoimaa transkriptiotekijää** (*hypoxia-inducible factor, HIF*), joka puolestaan stimuloi VEGF:n vapautumista solusta (Zelzer ym. 2001). Lisäksi VEGF:n erittymistä saa aikaan erilaiset sytokiinit, hormonit ja kasvutekijät, kuten IGF-1 ja insuliini (Zelzer ym. 2001, Zelzer ym. 1998). On tutkittu, että VEGF-reseptoreihin sitoutuvan liukoisen kimeerisen proteiinin (*soluble chimeric VEGF receptor protein*) injisoiminen vielä kasvaviin 24 vuorokautta vanhoihin hiiriin, inhiboi verisuonten tunkeutumista kasvulevyn hypertrofiselle vyöhykkeelle ja sai siten aikaan heikentynyttä trabekulaariluun muodostumista ja hypertrofisen vyöhykkeen laajenemista (Zelzer ym. 2001).

1.3.3 Ulkoiset tekijät

Kirjassaan Hall (2015) toteaa, että endokondraalisten luiden muotoutuminen pääpiirteittäin tietynlaisiksi kolmiulotteisiksi tyypilliset muotonsa omaaviksi tapahtuu ilman, että kehittyvään luuhun kohdistuu biomekaanisia voimia. Kuitenkaan luusto ei muovaudu tiukasti geenien ohjaamana, vaan sen lopulliseen muotoon vaikuttaa myös ympäristö, jossa yksilö elää.

Koska luuston kehittyminen alkaa jo kohdussa, jo **sikiöaikaiset ärsykkeet** kohdussa vaikuttavat siihen (Hall 2015). **Maternaaliset vaikutukset** yksilöön ja sen kehitykseen sikiökaudella ja vielä syntymän jälkeen ovat kehittyvän yksilön kannalta keskeisessä roolissa (Roman-Garcia ym. 2014, Oury ym. 2013, Dloniak ym. 2006). Sikiön istukan kautta saamat ravintoaineet ja esimerkiksi emon tuottamat hormonit säätelevät monia fysiologisia prosesseja sikiökaudella, ja tätä kautta vaikuttavat yksilön kasvuun ja terveyteen vielä tämän syntymän jälkeen (Roman-Garcia ym. 2014, Weaver ym. 2004).

Lähinnä jyrksijöillä tehdyistä tutkimuksista tiedetään, että luuston muodostumiseen ja muovautumiseen sekä kasvuun ja kypsymiseen vaikuttaa niin **kohdun sisäiset olosuhteet** kuin **kohdun ulkopuolelta tulevat ärsykkeet** (Hall 2015). Esimerkiksi tiedetään, että hiirisikiöillä luusto on sitä kehittyneempää, mitä vähemmän kohdussa on sikiöitä, ja vastaavasti luusto kehittyy hitaammin, jos sikiöitä on paljon (Garrard ym. 1974). Lisäksi tiedetään, että sikiöiden luuston kehittymiseen vaikuttavat myös kemialliset tekijät, kuten jotkut lääkeaineet sekä fysikaaliset tekijät, kuten äänentaajuudet ja painovoima (Hall 2015).

Yksilön kasvuun ja luumassan kertymiseen vaikuttavat yksilön omien ominaisuuksien lisäksi maternaaliset tekijät, vaikkakin emon tiineyden aikaisten ravintoainepuutoksien vaikutukset syntyvän yksilön kasvuun ja luumassaan on vielä varsin tuntematon (Roman-Garcia ym. 2014). Esimerkiksi Roman-Garcia ym. (2014) tutkimuksessaan osoitti hiirigeenimallilla, että B₁₂-vitamiinin puutos emolla tiineysaikana aiheuttaa syntyneillä poikasilla vakavaa kasvun hidastumista ja osteoporoosia. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin poikasten tilan vakavuuden ja oireiden ilmentymisen riippuvan emon perimästä. Tutkimuksessa poikasten B₁₂-vitamiinin puutos laski maksan tauriinin tuotantoa, mikä puolestaan näytti inhiboivan kasvuhormoni - IGH-1 -askelia. Tauriini lisää kasvuhormoniriippuvaisen IGH-1:n synteesiä maksassa, mikä puolestaan tehostaa osteoblastien toimintaa. Oraalinen tauriinilisä B₁₂-vitamiinin puutteesta kärsivillä poikasilla esti kasvun hidastumisen ja osteoporoosin muodostumisen. Näin ollen B₁₂-vitamiinin voidaan olettaa olevan välttämätön vitamiini vieroituksen jälkeisessä kasvussa ja luun muodostumisessa tauriinin välityksellä.

Luun päällä oleva luukalvo vaikuttaa luun kasvuun, sillä kasvulevyn kondrosyyttien jakautuminen hidastuu luukalvon aiheuttaman jännityksen seurauksena (Sêbek ym. 1972). Vastaavasti kasvulevyn pidentyminen saa aikaan myös luukalvon kasvua, jolloin myös kasvulevyyn kohdistuva paine vähenee, jolloin proliferoituvien kondrosyyttien jakautumisnopeutta ja pitkien putkiluiden kasvua rajoitetaan ja säädellään myös kondrosyyttien ulkopuolelta mekaanisesti (Moss 1972b). Myös luustoa ympäröivät kudokset vaikuttavat luiden kasvuun ja niiden lopulliseen muotoon (Hall 2015).

Jotta endokondraalinen luu kasvaisi normaalisti, tarvitsee se **mekaanista rasitusta** (Hall 2015). Yleisesti ottaen mitä enemmän luuhun kohdistuu mekaanista rasitusta, sitä tiheämmäksi luu muodostuu (Sjaastad ym. 2010). Etenkin syntymän jälkeen mekaaniset tekijät vaikuttavat kasvulevyihin (Hall 2015). Sekundaariset luutumiskeskukset muodostuvat luiden diafyysisiin pian syntymän jälkeen (Ross & Wojciech 2011). Kuitenkin se milloin sekundaariset luutumiskeskukset epifyysisiin muodostuvat on myös eläinlajikohtaisia eroja (Hall 2015). Lisäksi mekaanisen stressin tiedetään nisäkkäillä lisäävän tarvetta sekundaaristen luutumiskeskusten muodostumiselle (katsauksessa Haines 1942).

Tutkimuksissa on havaittu, että myös luuston kehittämisessä ja kasvussa on havaittavissa elimistön monien muiden prosessien tapaan **vuorokausivaihtelua ja sirkadiaanista vuorokausirytmiisyyttä** (Hall 2015, Sjaastad ym. 2010, Ishikawa ym. 1992). Esimerkiksi rottien kasvulevyjen solut ja entsyymit ovat aktiivisimmillaan aamuisin ja aamupäivisin (Stevenson ym. 1990). Valo on yksi kondrosyyttien vuorokausirytmiisyyden taustalla oleva tekijä. Valon määrä vaikuttaa todennäköisesti aivojen käpylisäkkeen ja siitä erittyvän melatoniinin kautta. Rotilla tehdyssä tutkimuksessa ruston kasvu hidastui, mikäli rotat olivat jatkuvassa valossa tai pimeydessä (Nir ym. 1972).

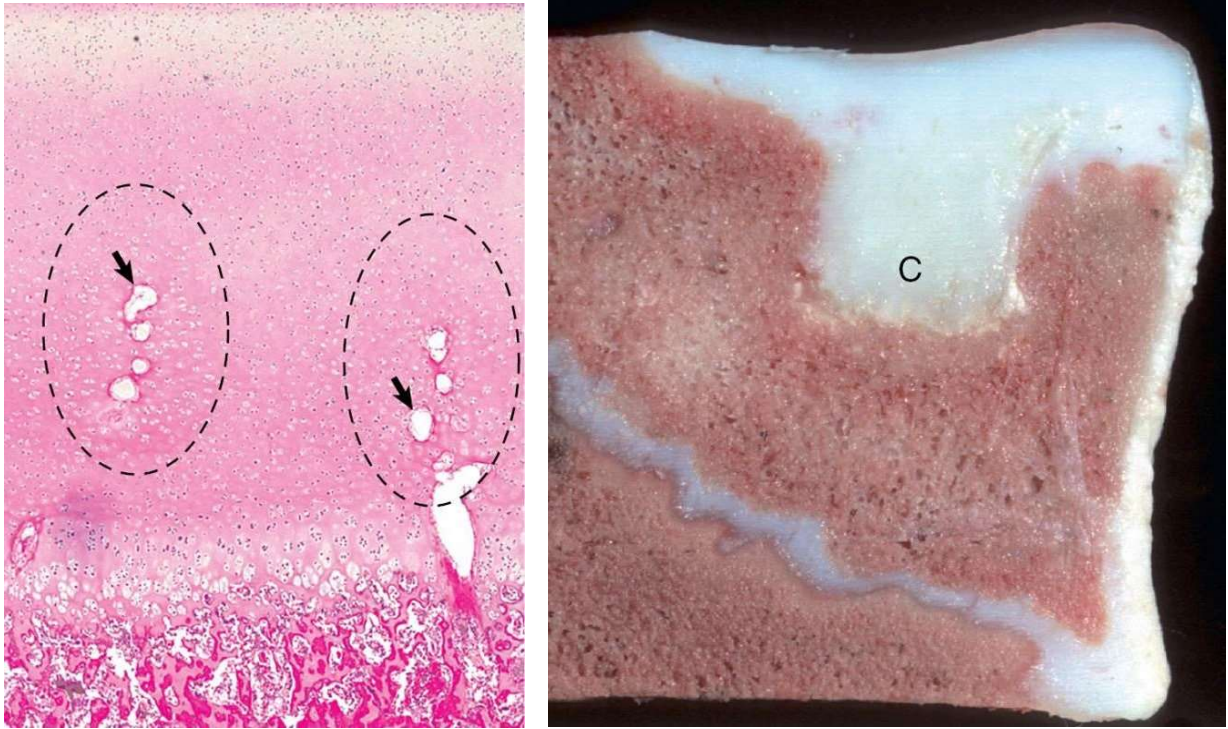
2 Osteokondroosi

Osteokondroosi (*osteochondrosis*) on kasvavilla koirilla, sioilla, hevosilla, naudoilla ja siipikarjalla sekä ihmisellä suhteellisen yleisenä esiintyvä endokondraalisen luutumisen häiriö (Olstad ym. 2015, Carlson & Weisbrode 2012). Sairautta esiintyy enemmän uroksilla kuin naarailla (Ytrehus ym. 2007). Termi osteokondroosi esiintyi kirjallisuudessa ensimmäisen kerran 1800-luvun loppupuolelta, ja sitä on käytetty kuvaamaan varsin laajasti erinäisiä nivelten kasvuruston fokaalisia tai multifokaalisia endokondraalisissa luutumisessa tapahtuneita häiriöitä ja viivästyksiä eri eläinlajeilla (Olstad ym. 2015, Carlson & Weisbrode 2012, Ytrehus ym. 2007). Eläinlääketieteessä diagnoosia on käytetty ensimmäisen kerran vasta 1900-luvun puolivälissä

(Leighton 1998, Craig & Riser 1965). Sairauden patofysiologian epäillään olevan kaikilla lajeilla sama, mukaan lukien ihmisellä (Ytrehus ym. 2007, Olsson ym. 1978). Sairaus ilmenee lähinnä kasvun aikana, sillä endokondraalista luutumista tavataan oikeastaan vain kasvurustossa (Olstad ym. 2015, Ytrehus ym. 2007, Hunziker ym. 2007). Osteokondroosille tyypilliset muutokset esiintyvät fokaalisesti ja/tai multifokaalisesti yleensä symmetrisesti ja bilateraalisesti joko metafyseaalilla kasvulevyillä tai epifyysien kasvurustolla luun ja nivelrustojen rajalla (*epiphyseal cartilage of the articular-epiphyseal complex, AEC*) (Carlson & Weisbrode 2012). Osteokondroosi jaotellaan kolmeen muotoon riippuen endokondraalisen luutumisen viivästymisen tai häiriön laajuudesta.

Lievimässä **latens-muodossa** (kuva 5 vasen) kasvurustossa esiintyy mikroskooppisesti havaittavia selvärajaisia fokaalisia nekroottisia alueita, jotka eivät yllä nivelrustoon eivätkä ilmene ruston alaisessa luussa (*a subchondral bone*) (Carlson & Weisbrode 2012). *Latens*-muodon osteokondroottinen vaurio ilmenee jo kasvulevyn lepovyöhykkeellä olevassa rustokudoksessa (Carlson & Weisbrode 2012, Ytrehus ym. 2007). Spontaanisti muodostuvien leesioden arvellaan johtuvan muodostuvan verisuonituksen ja luutumisrintaman etenemisen epäsuhdasta kasvun aikana (Olstad ym. 2015). Nykyisin tiedetään, että hevosilla osteokondroosin varhaisimmat subkliiniset muutokset ilmenevät yksilön ensimmäisten elinkuukausien aikana ja ovat mahdollisesti voineet muodostua jo kohdussa (Laverty & Girard 2013). Varhaiset muutokset voivat joko parantua täysin tai kehittyä ja laajentua vakavimmiksi osteokondroottiksi muutoksiksi (Olstad ym. 2015, Laverty & Girard 2013).

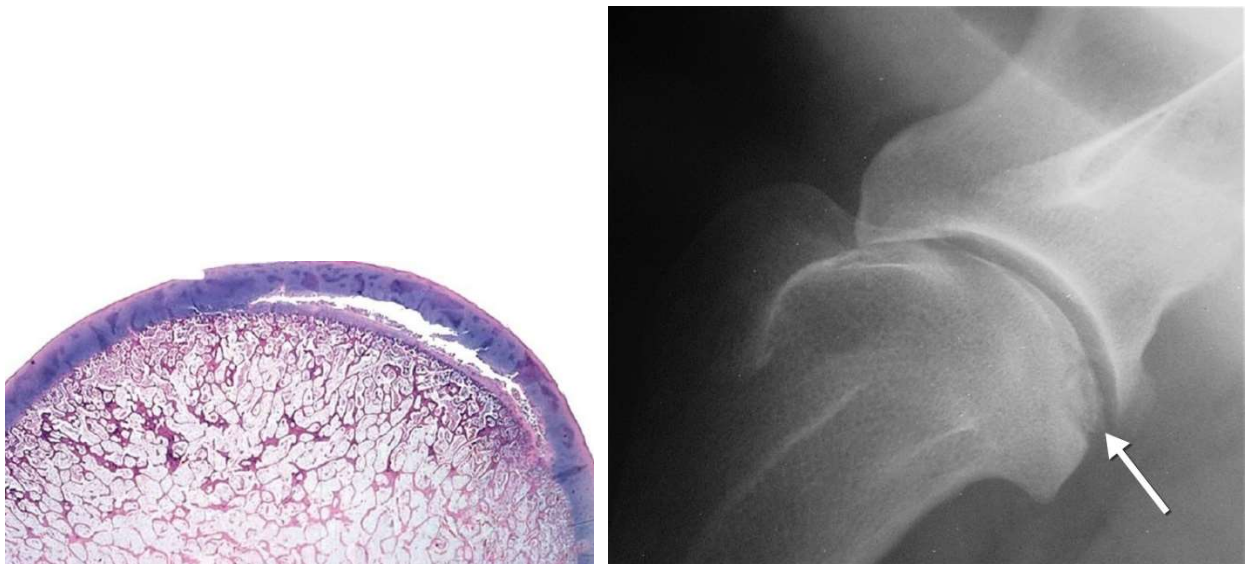
Manifesta-muodossa (kuva 5 oikea) edellä kuvatut endokondraalisen luutumisen häiriöstä aiheutuneet muutokset ovat laajemmat, jolloin ne ovat havaittavissa makroskooppisesti ja röntgenkuvissa (Ytrehus ym. 2007). Kun lievät osteokondroosimuutokset eivät katoakaan, havaitaan muutoksissa fagosytoosia sekä granulaatiokudoksen intramembranoottista luutumista (Olstad ym. 2015). Osassa *manifesta*-muodoissa nekroottisia muutoksia löytyy jo subkondraalisessa eli ruston alaisessa luussa (Laverty & Girard 2013, Carlson & Weisbrode 2012).



Kuva 5. Vasemmalla histologinen *Osteochondrosis latens* -muutos. Oikealla makroskooppinen *Osteochondrosis manifesta* -muutos (kuvat kirjasta Carlson & Weisbrode 2012, s. 943).

Osteokondroosin vakavimmassa ***dissecans*-muodossa** makroskooppiset muutokset yltävät nivelruston ja sen alaisen luun väliseen liitokseen asti, jolloin joissakin tapauksissa nekrotisoitunut nivelrusto irtoaa osittain tai kokonaan. Tällöin nivelruston alainen luu paljastuu, mikä puolestaan aiheuttaa nivelessä kivuliaan steriilin tulehdusreaktion, jolloin sairaudesta käytetään nimitystä *osteochondritis dissecans* (Olstad ym. 2015, Carlson & Weisbrode 2012, Ytrehus ym. 2007).

Osteokondroosin vakavimmille muodoille on tunnusomaista paikallinen kasvuruston säilyminen ja paksuuntuminen, sekä ruston mineralisoitumisen estyminen. Kasvulevyssä tämä näkyy histologisesti elinkelpoisten hypertrofisten kondrosyyttien kertymisenä sekä epifyysin luun ja nivelruston rajalla epifyyseaalisen ruston nekrotisoitumisena (Carlson & Weisbrode 2012).

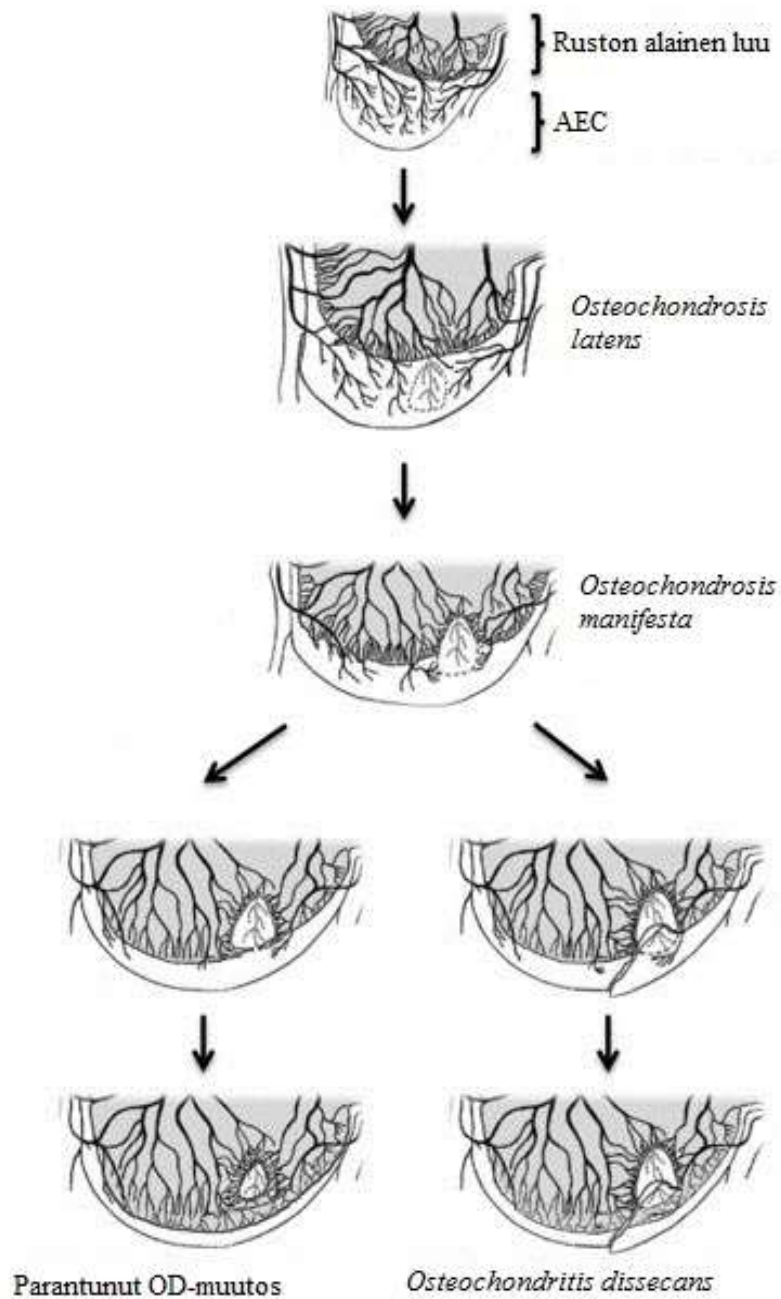


Kuva 6. Vasemmalla histologinen *Osteochondritis dissecans* -muutos (kuva kirjasta Carlson & Weisbrode 2012 s. 944). Oikealla röntgenkuva (lateraaliprojektio) olkanivelen kaudaalireunalla havaittavasta *Osteochondritis dissecans* -muutoksesta koiralla (kuva artikkelista Kerrigan & Robinson 2016).

Osteokondroosin *latens*- ja *manifesta*-muodot ovat yleensä aina subkliinisiä, mutta osteokondroosi vakavin *dissecans*-muoto voi ilmetä erilaisin oirein. Tyypillisin oire on kuitenkin ontuminen, mikä voi olla kuitenkin vaikea havaita, mikäli muutos ilmenee bilateraalisesti (Carlson & Weisbrode 2012). Lähes kaikki aiemmat tutkimukset osteokondroosista painottuvat taudin vakavimpaan kliinisiin oireita aiheuttavaan muotoon, jossa nimensäkin mukaisesti on mukana nivelruston alta paljastuneesta subkondraalisesta luusta ja nivelontelossa olevasta irtopalasta aiheutunut tulehdusreaktio, joka puolestaan vaikeuttaa todellisen aiheuttajan löytämistä ja etiologian hahmottamista (Olstad ym. 2015, Laverty & Girard 2013, Carlson & Weisbrode 2012, Ytrehus ym. 2007).

Koiralla esiintyy artikulaarista osteokondroosia olkaluun proksimaalipään kaudaalireunalla (*caput humeri*), olkaluun distaalipään mediaalisessa kondyluksessa (*condylus humeri medialis*), niin reisiluun distaalipään mediaalisessa kuin lateraalissa kondyluksessa (*condylus humeri lateralis et medialis*) sekä kintereen taluksen eli telaluun mediaalisessa ja lateraalissa harjanteessa (*trochlea tali*) (Carlson & Weisbrode 2012, Ytrehus ym. 2007). Lisäksi kyynärluun distaalipään fyysissä ja ristiluussa on kuvailtu esiintyvän osteokondroosia (Ytrehus ym. 2007). Katsauksessaan Michelsen (2013) toteaa, ettei kaikkien koirilla kyynärnivelistä muiden esiintyvien irtopalamuutosten nykytiedon valossa katsota olevan osteokondroosiprosessin aiheuttamia, vaan aiheutuvan kyynär- ja varttinäluun pituuseroista kasvuaikana. Toistaalta

ainakin mediaalisen varislisäkkeen muutosten patofysiologia on vielä epäselvä, ja yhtenä vaihtoehtona on esitetty endokondraalisessa luutumisessa tapahtuvaa häiriötä (Michelsen 2013).



Kuva 7. Kuvassa esitetään kaavamaisesti osteokondroosimuutosten etenemisestä (kuva muokattu artikkelin Ytrehus ym. 2007 kuvasta).

2.1 Monisyinen etiologia

Katsauksessaan Bruns ym. (2017) toteaa osteokondroosin etiologian olevan edelleen epäselvä. Tällä hetkellä todennäköisimpinä osteokondroosin aiheuttajina pidetään geneettistä alttiutta sekä muutokselle altistavaa anatomista rakennetta ja muodostuneen verisuonituksen paikallista nekrotisoitumista (Ytrehus ym. 2007). Osteokondroosi on eläimillä yhdistetty nopeaan kasvuun etenkin kasvun alkuvaiheessa (Haysom ym. 2017). Taustalla ajatellaan olevan monitekijäiset syyt, joista mekaaninen kuormitus toistuvien mikrotraumojen kautta voisi olla merkittävässä roolissa (katsauksessa Accadbled ym. 2017, Krause ym. 2015). Ravinnon osuutta osteokondroosin puhkeamiseen ollaan myös jonkin verran tutkittu (Ytrehus ym. 2007).

2.1.1 Perinnöllisyys, anatomisesti altistavat rakenteet ja vaskulaariset tekijät

Se, että osteokondroosia esiintyy koirilla tyypillisesti tietyillä roduilla, kertoo sairauden perinnöllisyydestä (Lafond ym. 2002). Sama ilmiö on havaittu myös sioilla ja hevosilla (Ytrehus ym. 2007). Myös ihmisillä esiintyvissä osteokondroottisissa muutoksissa on viitteitä sairauden perinnöllisyydestä (Ytrehus ym. 2007). Osteokondroosia esiintyy kuitenkin koirilla suhteellisen laajalla rotukirjolla, vaikkakin esiintyvyys painottuu keskikokoisista roduista jättiläisrotuisiin koiriin (LaFond ym. 2002). Labradorinnoutajilla osteokondroosin on havaittu olevan polygeenisesti periytyvä (Padgett ym. 1995). Nopeakasvuisuus ja anatomiset rakenteet ovat kuitenkin osittain periytyviä ja sitä kautta voisivat altistaa osteokondroosin puhkeamiselle (Ytrehus ym. 2007). Osteokondroosin taustalla voi olla luiden nopea kasvu yhdessä mekaanisen rasituksen kanssa sekä kasvulevyihin vaikuttavat hormonaaliset tekijät, jotka yhdessä tai erikseen saavat aikaan häiriöitä endokondraalisessa luutumisessa (Richardson & Zentek 1998).

Nopeakasvuisuus on yhdistetty suuri- ja jättikokoisilla koiraroduilla osteokondroosin, lonkkadysplasian ja nivelrikon kehittymiseen (Schoenmakers ym. 2000, Nap ym. 1991). Nopeasti kasvamaan jalostetuilla eläimillä on havaittu esiintyvän enemmän osteokondroosia, joskin tästä on varsin ristiriitaisia tutkimustuloksia (Ytrehus ym. 2007). Vaikka osteokondroosia ilmenee nopeasti kasvavilla eläimillä, juuri nopean kasvun vaiheessa, ei kokeellisesti olla pystytty todentamaan nopeakasvuisuutta yksinomaan osteokondroosin aiheuttajaksi (Carlson & Weisbrode 2012).

Hand ym. 2010 koostamassa kirjassa todetaan, että syntyessään koiranpennun luusto on vielä noin 98 prosenttisesti rustoinen, ja ettei koiran luusto mahdollista liikkumista heti syntymän jälkeen. Koiranpennulla on keskimäärin kyky seistä noin kymmenen vuorokauden ikäisenä, ja

vastaavasti kävelemään pennut kykenevät noin kolmen viikon ikäisinä ja juokseminen pennuilta luonnistuu noin kuukauden vanhoina. On tutkittu, että alle kolmen kuukauden ikäisillä koiranpennuilla portaiden kävely lisää lonkkadysplasiariskiä, kun taas liikkuminen vapaana pehmeällä alustalla vähentää riskiä (Krontveit ym. 2012). Pitkissä putkiluissa osteokondroosi voi vaikuttaa luiden muotoon, mikä puolestaan voi näkyä asentovirheinä raajoissa (Richardson & Zentek 1998). Virheellinen anatominen rakenne voi vaurioittaa kehittyviä ja kasvavia luita normaalissa mekaanisessa rasituksessa. Michelsenin 2013 julkaistussa katsauksessa todettiin kyynärluun varislisäkkeen lohkeaman (*fragmented medial coronoid process*) ja kyynärluun anconeuslisäkkeen irtoamisen (*ununited anconeal process*) johtuvan kyynär- ja värttinäluiden pituuseroista kasvuaikana pituuseron aiheuttaessa kohtuuttoman suurta mekaanista rasitusta kyseisiin luurakenteisiin ja saaden aikaan niiden vaurioitumisen ja jopa irtopalan lohkeamisen. Se saako toistuva mekaaninen trauma aikaan osteokondroottisia muutoksia vai pahenevatko osteokondraaliset muutokset mekaanisesta rasituksesta on vielä epäselvää (Daemmerich 1991, Carlson ym.1991, Hazewinkel ym. 1985). Kuitenkin varhaiset vauriot voivat korjaantua jopa itsestään, ja liikunnan rajoittaminen osteokondroosin varhaisissa *latens*- ja *manifesta*-vaiheissa voi ehkäistä *dissecans*-muodon kehittymistä irtopaloiheen (Semevolos 2017). Kuitenkaan varsoilla van Weeren ym. (1999) tekemässä tutkimuksessa liikunta ei lisännyt osteokondroosimuutosten esiintymistä, mutta vaikutti syntyneiden muutosten laajuuteen. Mutta myös liikunnan vähyden hyvin nuorena on esitetty olevan yhteydessä vakaviin muutoksiin.

Olstadin ym. (2015) toteaa katsauksessaan, että hevosilla ja sioilla osteokondroottisissa muutoksissa verisuonet ja niiden ympärillä olevat epifyseaalisen kasvuruston kondrosyytit nekrotisoituvat johtuen iskemiasta, jolloin luutumisen paikallisesti pysähtyy. Niin artikulaarisen kuin metafyseaalisen osteokondroosin patogeneesin taustalla voisi siis olla paikallinen verisuonituksen häiriö kaikilla eläinlajeilla (Ytrehus ym. 2007). Aivan mineralisointivyöhykkeen lähellä olevien rustokanavien vaurio syntymän jälkeen on hyvin todennäköisesti taustalla osteokondroosin kehittymiselle (Semevolos 2017). On esitetty, että normaalia heikompi rustorakenne olisi osallisena osteokondroosin muodostumiselle, jolloin rustokudoksessa oleva verisuonitus helpommin kärsii mekaanisessa rasituksessa (Lavery & Girard 2013). Rustokanavien vaurioituminen puolestaan todennäköisesti johtuu joko epänormaalista rustokudoksen soluväliaineesta ja/tai rustokanavien vaurioitumisesta mekaanisesta syystä (Semevolos 2017). Mutta siitä miten perimä ja ympäristö yhdessä vaikuttavat osteokondroosin puhkeamiseen ei ole vielä varmaa tietoa (Olstad ym. 2015, Ytrehus ym. 2007). Tulevaisuuden tutkimuksissa pyritään selvittämään mikä todellisuudessa aiheuttaa

verisuonituksen muodostumisen epäonnistumisen sekä osteokondroosin perinnöllisyyttä ja periytyvyyttä (Olstad ym. 2015).

2.1.2 Ravinnon vaikutus koiran osteokondroosin kehittymiselle

Luuston muodostuminen tarvitsee riittävästi ainakin energiaa, aminohappoja, kalsiumia, fosforia, magnesiumia, sinkkiä, kuparia, mangaania sekä C-, D- ja B₁₂-vitamiinia kollageenien muodostumiseen, mineralisoitumiseen sekä ruston ja luun metaboliaan (Prenticer 2006). Niin sanottujen pääravintoaineiden hiilihydraattien ja rasvojen sekä proteiinien puutteen katsotaan aiheuttavan luuston kehityksen ja kasvun hidastumista sekä pahimmillaan pysähtymistä niin ennen syntymää kuin syntymän jälkeen (Hand ym. 2010, Prentice ym. 2006, Romsos ym. 1981). Yleisesti ottaen tiineen nartun energian eli hiilihydraattien ja rasvojen sekä proteiinin tarve kasvaa vasta viimeisellä kolmanneksella ja jatkuu vieroitukseen asti (Hand ym. 2010, NRC 2006). Nartun energiantarpeeseen vaikuttaa pentuekoon lisäksi emän kuntoluokka ja ruokahalu (Hand ym. 2010). Laktaation aikana nartun energiantarve voi olla jopa kolminkertainen verrattuna normaalin aikuisen koiran energian tarpeeseen, etenkin jos pentuekoko on suuri (Greco 2014). Nartun syövä ravinto vaikuttaa myös maidon laatuun ja maidon aminohappo- ja rasvahappokoostumukseen (Hand ym. 2010, Heinemann ym. 2005). Nartun tarvitsema energiamäärä saavutetaan helposti ruuan rasvapitoisuutta nostamalla, kuitenkin unohtamatta muita ravintoaineita, joiden tarve kasvaa suhteessa saman verran (Hand ym. 2010, NRC 2006). Nartuilla, joilla pentuja on neljä tai enemmän, tulisi ruuassa olla rasvaa noin 20 prosenttia ruuan kuiva-aineesta, myös jättikokoisilla roduilla (Hand ym. 2010).

Eri koirarotujen kasvunopeudessa on suuria eroja, esimerkiksi kääpiö villakoira on fysiologisesti aikuinen jo kuudesta kahdeksaan kuukauden ikäisenä, kun taas tanskandoggi saavuttaa fysiologisen aikuisuuden vasta noin kolmivuotiaana (Greco 2014). Tästä johtuu myös se, että nopeasti aikuisuuden saavuttavilla roduilla pennuille tarkoitetut kaupalliset täysravinnot ovat energia- ja proteiinirikkaampia, kuin hitaammin aikuiskokonsa saavuttavilla suuri- ja jättirotuisilla koiraroduilla, joilla kaupalliset täysravinnot sisältävät vähemmän energiaa, mutta riittävästi proteiinia (Greco 2014).

Yleisesti kasvavan pennun proteiinin tarve eroaa aikuisen koiran proteiinin tarpeesta niin määrällisesti kuin laadullisesti, pennuilla proteiinin tarpeen ollessa suurimmillaan heti vieroituksen jälkeen, minkä jälkeen se laskee asteittain (Case & Czarnecki-Maulden 1990, Burns ym. 1982). NRC 2006 mukaan 14 viikkoisilla ja sitä vanhemmilla pennuilla ruuan raakaproteiinipitoisuuden tulisi olla vähintään 17,5 prosenttia kuiva-aineesta. Kuitenkin yleensä

penturuokien proteiinipitoisuudet vaihtelevat 22 prosentista 32 prosenttiin (Hand ym. 2010). Vaikka aiemmin on ollut jotakin näyttöä luuston kasvuhäiriöiden ja ruuan liiallisen proteiinipitoisuuden välillä, on sen jälkeen tutkimuksissa havaittu, ettei luuston kasvu häiriinny raakaproteiinipitoisuuden ollessa 22-31 prosenttia kuiva-aineesta, etenkin kun ruuan energia- ja kalsiumpitoisuudet ovat oikeat (Nap ym 1991). Ravinnon rasvoista saadaan energian lisäksi välttämättömiä rasvahappoja, kuten DHA:a ja linoleenihappoa, minkä lisäksi rasvat mahdollistavat rasvaliukoisten vitamiinien imeytymisen (Hand ym. 2010). Ravinnon rasvojen myötä myös ruuan sulavuus ja rasvoista saadun energian avulla typen hyödynnettävyys paranee (Hand ym. 2010).

Liiallisesta ravinnonsaannista aiheutuvasta liian nopeasta kasvutahdista osteokondroosille altistavana tekijänä ollaan kahta mieltä. Osassa tutkimuksista puhutaan väitteen puolesta. Muun muassa Hedhammar ym. (1974) tekemän tutkimuksen mukaan rajoittamaton ruokinta aiheuttaa häiriöitä ruston kypsymisessä ja luun resorbtiossa verrattuna energian, proteiinien, kalsiumin ja fosforin osalta rajoitettua ruokavaliota saaneisiin. Lisäksi ravinnon liikasaanti on liitetty suurikokoisten koiranrotujen pennuilla ylipainoon ja nivelrikon kehittymisen todennäköisyyden lisääntymiseen (Dobenecker ym. 2013, Kealy ym. 2002). Kun taas toisten tutkimusten mukaan yhteyttä ei ole. Esimerkiksi Huck ym. (2009) julkaistussa pitkittäisessä kohorttitutkimuksessa seurattiin nivelrikon muodostumista kyynärpäihin labradorinnoutajilla koko niiden elämän ajan. Tutkimuspopulaatio jaettiin kahteen ryhmään, jossa puolelle ryhmästä samaa ruokaa annettiin 25 prosenttia vähemmän verrattuna kontrolliryhmälle annettuun ruokaan. Yhdelläkään tutkimukseen osallistuneella koiralla ei diagnosoitu kliinisesti eikä röntgenkuvissa osteokondroosin aiheuttamia muutoksia (Huck ym. 2009). Lihavuuden tiedetään lisäävän solujen oksidatiivista stressiä (Hand ym. 2010). Haysomin ym. (2017) urosrotilla tekemässä tutkimuksessa havaittiin, että vieroituksen jälkeen aloitettu runsaasti rasvaa sisältävä ruokavalio sai aikaan häiriöitä endokondraalisessa luutumisessa ruston ja luun rajalla epifysealisessa rustossa. Muutokset olivat tyypillisiä varhaisen vaiheen artikulaariselle osteokondroosille. Rotilla, joilla muutoksia havaittiin, olivat kohtalaisen ylipainoisia ja niillä oli havaittavissa lievä krooninen tulehdustila ja kohonnut plasman *tumor necrotic factor-alfa* -pitoisuus.

2.1.2.1 Aminohapot

Ruuan sulatukanavassa kaikki valkuaisaineet pilkkotaan yksittäisiksi aminohapoiksi (Sjaastad 2010). NRC (2006) mukaan koiralle välttämättömät aminohapot ovat arginiini, histidiini, isoleusiini, leusiini, lysiini, metioniini, fenyylialaniini, treoniini, tryptofaani ja valiini, joita on saatava ravinnosta elimistön aineenvaihduntaan sekä kudosten uudistumiseen ja kasvuun. Loput

11 aminohappoa koiran elimistö pystyy valmistamaan muista aminohapoista. Niin kutsuttuja rajoittavia aminohappoja ovat sellaiset välttämättömät aminohapot, joita saadaan ravinnosta vähemmän kuin niitä tarvitaan (Erdman ym. 2012). Esimerkiksi pennuilla arginiini on välttämätön aminohappo, kun taas aikuiselle se on ehdollisesti välttämätön eli rajoittava aminohappo (Young ym. 1978). Välttämättömän aminohapon puutos alentaa sekundaarisesti ruokahalua erityisesti kasvin- ja sekasyöjillä, muttag ainakin jossain määrin myös lihansyöjillä ja sitä kautta heikentää kasvua (NRC 2006, Gietzen 1993, Milner 1979 a, b). Alla on käsitelty lyhyesti muutamia aminohappoja, joiden tiedetään osallistuvan kasvuun.

Fenyylylalaniini ja tyrosiini. Tyrosiini ei ole koiralle välttämätön aminohappo, mutta se syntetisoidaan fenyylylalaniinista ja näin ollen tyrosiinin riittävä saanti vähentää fenyylylalaniinin tarvetta (Hand ym. 2010, NRC 2006). Fenyylylalaniinia ja tyrosiinia tarvitaan kudosten kasvussa, maksimoimaan mustan karvan pigmentti sekä proteiinien, kilpirauhashormonien ja katekoliamiinien synteessissä (NRC 2006, Biourge & Serheraert 2002).

Tauriini. Huxtablen (1992) katsaukseen on koottu tauriinin osallistuvan muun muassa yksilön kehitykseen ja kasvuun sekä immuunipuolustukseen ja antioksidatiivisiin reaktioihin. Tauriini ei ole koiralle välttämätön aminohappo, jos ravinto sisältää riittävästi rikkipitoisia aminohappoja, kysteiiniä ja metioniinia, joista sitä syntetisoidaan elimistössä (NRC 2006, Delaney ym. 2001, Kramer ym. 1995). Tauriinin liikasaannista ei tiedetä olevan haittaa koiralle (NRC 2006). Tauriinilisän on raportoitu lisäävän D-vitamiinin imeytymistä keskosvauvoilla (Zamboni ym. 1993). Tauriini myötävaikuttaa vieroituksen jälkeisessä kasvussa ja luun muodostumisessa osallisena olevan B₁₂-vitamiinin toimintaan (Roman-Garcia ym. 2014).

2.1.2.2 Vitamiinit ja kivennäisaineet

Luuston kasvun kannalta olennaisia vitamiineja ovat ainakin A-, B₁₂-, C- ja D-vitamiinit (NRC 2006). Vitamiinien imeytymiseen vaikuttaa ravinnon koostumus, esimerkiksi rasvaliukoisten vitamiinien imeytymiseen vaikuttaa ravinnon rasvapitoisuus ja rasvojen sulavuus. Vastaavasti makrokivennäisaineista eli kivennäisaineista kalsium, fosfori ja magnesium, sekä mikrokivennäisaineista eli hivenaineista kupari, sinkki, mangaani, boori ja pii. Yleisesti ottaen kivennäisaineiden imeytymiseen suolistosta vaikuttaa niiden suolamuoto ja muu kivennäisaineet, mutta myös eri vitamiinit (Erdman ym. 2012, NRC 2006). Nartun lähes kaikkien hivenaineiden tarve riippuu pentuekoosta (Hand ym. 2010). Läheskään kaikille vitamiineille eikä kivennäisaineille ei ole määritetty saantisuosituksia ja suurin osa tutkimuksista koirien

vitamiinien tarpeesta on verrattain vanhoja eikä niissä ole pyritty edes määrittämään optimaalisia saantisuosituksia edes laji- saati rotukohtaisesti (NRC 2006).

2.1.2.2.1 Rasvaliukoiset vitamiinit

A-vitamiinia ja sen johdannaisia tarvitaan muun muassa solujen erilaistumiseen ja kasvuun sekä normaalissa yksilönkehityksessä (NRC 2006). Pennuilla on syntyessään hyvin pienet A-vitamiinivarastot, minkä takia nartun maidon tulee sisältää sitä runsaasti (Kempe ym. 2010). A-vitamiinin liikasaannin suurilla annoksilla on havaittu aiheuttavan koiranpennuille muun muassa laihtumista, kasvun hidastumista sekä muutoksia kehittyvissä pitkissä putkiluissa; reisi-, sääri-, kyynär- ja varttinäluissa osteoporoottisia muutoksia, etujalkojen epifyysien sekä karpaali- ja tarsaalinelvellen alueen palpaatiokipua, luiden epifyseaalinen ruston ohenemista ainakin sääri- ja kyynärluissa sekä kasvulevyjen ennenaikaista sulkeutumista (NRC 2006, Cho ym. 1975). Etenkin A-vitamiinin liikasaanti voi yhdessä mangaanin puutoksen kanssa johtaa ennenaikaiseen kasvulevyjen sulkeutumiseen, mikä puolestaan johtuu fyseaalinen kasvuruston soluväliaineen heikentymisestä tai tuhoutumisesta. Kasvulevy voi sulkeutua kokonaan estäen luun pituuskasvun tai vaan paikallisesti esimerkiksi paikallisessa traumaattisessa verisuonivauriossa, jossa endokondraalinen luutuminen jatkuu muuten normaalisti aiheuttaen raajan/raajojen vinoon/käyrään kasvamisen vauriokohdasta alkaen (*angular limb deformity*) (Carlson & Weisbrode 2012).

D-vitamiini eli kalsiferoli on yhdessä parathormonin ja kalsitoniinin kanssa tärkeässä roolissa elimistön kalsiumin ja fosforin homeostasian säätelyssä ja ylläpidossa (kirjassa Norman & Henry 2012, NRC 2006). D-vitamiinin elimistössä aktiivinen muoto D₃-vitamiini eli kalsitrioli tehostaa kalsiumin ja fosforin kulkeutumista suoliston epiteelisolujen, mutta myös muiden epiteelisolujen, läpi elimistöön. Tämän lisäksi D-vitamiini on olennaisessa osassa monien muiden solujen ja kudosten, kuten parathormonia tuottavien solujen eli lisäkilpirauhasen pääsolujen erilaistumisessa ja jakautumisessa (Sjaastad ym. 2010). Tärkein kalsitriolin säätelijä on parathormoni, jonka erityis lisääntyä solujen ulkoisen kalsiumin ja fosforin määrän ollessa alhainen, jolloin D-vitamiinin varastomuoto muunnetaan elimistössä aktiiviseen muotoon. Puolestaan hyperkalsemia ja -fosforemia inhiboivat kalsitriolin synteesiä (Norman & Henry 2012, Sjaastad ym. 2010).

Kasvin- ja sekasyöjät kykenevät ihossaan ainakin osittaiseen D₃-vitamiinisynteesiin, jossa D-vitamiinia tuotetaan ihon epidermiksessä 7-dehydrokolesterolista auringon UVB-säteilyn vaikutuksesta (Norman & Henry 2012, Hazewinkel & Tryfonidou 2002, Morris 1999, Nap &

Hazewinkel 1994, How ym. 1994). Kun taas lihansyöjät, kuten koira, ovat ainakin osittain riippuvaisia ravinnosta saatavasta D-vitamiinistä, koska koirien ihossa on todettu olevan alhaisempi 7-dehydrokolesteroli pitoisuus kuin muilla D-vitamiinisynteesiin ihossaan pystyvillä eläimillä (NRC 2006, Hazewinkel & Tryfonidou 2002, Morris 1999, Nap & Hazewinkel 1994, How ym. 1994). Tätä vahvistaa havainto, jossa kissoilla kokeellisesti lisätyn 7-dehydrokolesterolin pelkistävän reduktaasi-entsyymin inhibiittorin vaikutuksesta tapahtuu D-vitamiinisynteesiä (Morris 1999). Näin ollen voidaankin ajatella, että kissojen lisäksi myös koiralla 7-dehydrokolesterolin pelkistävä reduktaasi-entsyymi muuttaa 7-dehydrokolesterolin nopeasti kolesteroliksi ja näin ollen tekee ne riippuvaiseksi ravinnosta saatavasta D-vitamiinista (NRC 2006). Yleisestikin ottaen D-vitamiinista tulee ravinnosta välttämättömästi saatava vitamiini, mikäli yksilö ei syystä tai toisesta pysty olemaan riittävän pitkiä aikoja auringossa, jolloin plasman D₃-vitamiinin esiasteen eli kalsidiolin pitoisuus laskee liian alhaiseksi (Norman & Henry 2012).

Ravinnosta saatavaa D-vitamiinia on kahta muotoa (Sjaastad ym. 2010). D₂-vitamiinia eli ergokalsiferolia saadaan kasveista, ja D₃-vitamiinia eli kolekalsiferolia eläinkunnantuotteista, kuten maksasta ja kalanmaksaöljystä (Sjaastad ym. 2010, Nap & Hazewinkel 1994). Aiemmin kumpaakin D-vitamiinimuotoa on pidetty lähes yhtä aktiivisia nisäkkäiden elimistössä (Norman & Henry 2012). Kuitenkin muutamissa tutkimuksissa D₃-vitamiinin on osoitettu olevan D₂-vitamiinia tehokkaampaa (Heaney ym. 2011, Armas ym. 2004, Trang ym. 1998). Tauriinilisän on raportoitu lisäävän D-vitamiinin imeytymistä keskosvauvoilla (Norman & Henry 2012, Zamboni ym. 1993).

D-vitamiinin puutos saa nuorissa nisäkkäissä aikaan luiden pehmenemistä eli riisitautia, jossa ihmisellä havaitaan luiden epämuodostumista, erityisesti ranteissa, polvissa ja nilkoissa sekä muutoksia kylkiluiden kostokondraalisissa nivelissä (*'rachitic rosary'*) (Norman & Henry 2012, Sjaastad ym. 2010, Norman 1979). Koiralla ensimmäiset D-vitamiinin puutoksen aiheuttamat muutokset havaitaan kyynärluun distaalipään epifyysin painumisena, epifyseaalisen ruston määrä lisääntymisenä, hiljattain luutuneen luun röntgentiiviuden häviämisenä sekä pitkien painoa kannattelevien putkiluiden painumisena (NRC 2006). D-vitamiinin puutosta ilmenee helpommin nopea- kuin hidaskasvuisilla koirilla (NRC 2006). Kalsiumin puutoksessa havaitaan samantyyppisiä oireita, kuten luiden puutteellinen mineralisaatio ja kivusta johtuva ontuminen (Norman & Henry 2012, NRC 2006). Maierin ym. (2016) tekemässä retrospektiivisessä tutkimuksessa havaittiin, että lapsilla, joilla oli diagnosoitu osteokondroosi, oli myös alhainen kalsidiolin pitoisuus seeruminäytteessä kontrolliryhmään verrattuna. Näin ollen D-vitamiinin

puute voi olla yksi osatekijä altistamassa osteokondroosin kehittymiselle. Puolestaan liiallinen D-vitamiini liikasaanti aiheuttaa hyperkalsemiaa ja pehmyt kudosten metabolista kalsifioitumista (Sjaastad ym. 2010). Koirilla liiallisen, muttei kuitenkaan vielä toksisen, D-vitamiinin saannin on todettu vähentävän luuston uudelleen muokkausta ja aiheuttavan vakavia häiriöitä endokondraalisessa luutumisessa vaikuttaen suoraan hypertrofisten kondrosyyttien kypsymiseen ja epäsuorasti mineralisoituneeseen metafyseaalialueen uudelleen muokkaamiseen (Tryfonidou ym. 2003).

2.1.2.2.2 Vesiliukoiset vitamiinit

B₁₂-vitamiini eli kobalamiini ja sen johdannaisina muodostetut kofaktorit ovat välttämättömiä monissa elintärkeissä soluprosesseissa, kuten sitruunahappokierrossa, aminohapposynteesissä ja DNA:n metylaatioissa (Roman-Garcia ym. 2014, katsauksessa Kalhan ja Marczewski 2012, katsauksessa Nielsen ym. 2012, kirjassa Stabler 2012). B₁₂ -vitamiinia syntetisoi ruuansulatuskanavan, maaperän ja jätevesien mikro-organismit (NRC 2006). Vaikka koiran ruuansulatuskanavan mikrobit kykenevät muodostamaan kobalamiinia koboltista, ei koira voi itse käyttää sitä, sillä B₁₂-vitamiinin imeytyminen tapahtuu ruuansulatuskanavassa aiemmin (NRC 2006). Näin ollen B₁₂-vitamiinia tulisi saada eläinkunnantuotteita sisältävästä ravinnosta (Stabler 2012, NRC 2006). B₁₂-vitamiinin imeytyminen koirilla ohutsuolistosta verenkiertoon vaatii mahalaukun sisäistä tekijää (*gastric intrinsic factor, GIF*), joka muodostaa kobalamiinin kanssa imeytymisen mahdollistava kompleksin (Stabler 2012, NRC 2006, Gazet & McColl 1967). Mahalaukun sisäisen tekijän tuotannon väheneminen näkyy B₁₂-vitamiinin puutteena (Roman-Garcia ym. 2014, Nielsen ym. 2012). Koirilla haima tuottaa suurimman osan mahalaukun sisäisestä tekijästä (Vaillant ym. 1990, Batt ym. 1989, Batt & Horadagosa 1989). Nisäkkäät varastoivat B₁₂-vitamiinia maksaansa ja voivat kierrättää sitä elimistössään (Roman-Garcia ym. 2014, Lazar & Birnbaum 2012). Kobalamiinin tiedetään koiralla osallistuvan ainakin kahden koentsyymin muodostamiseen (NRC 2006). Ihmisillä B₁₂-vitamiinin puutteen tiedetään aiheuttavan pernisiöösien anemian lisäksi kasvun hidastumista, alhaisempaa luun tiheyttä ja sitä kautta suurempaa luun murtumisriskiä, vaikkakin mekanismi on vielä osittain tuntematon (Roman-Garcia ym. 2014, Stabler 2012). B₁₂-vitamiinin voidaan kuitenkin tauriinin välityksellä olettaa olevan välttämätön vitamiini vieroituksen jälkeisessä kasvussa ja luun muodostumisessa (Roman-Garcia ym. 2014).

C-vitamiinilla eli askorbiinihappolla on monia tärkeitä tehtäviä elimistössä. C-vitamiini toimii antioksidanttina ylläpitäen entsyymiaktiivisuutta pitäen esimerkiksi kollageenisynteesissä tarvittavat Cu²⁺- ja Fe²⁺-ionit pelkistetyssä muodossa (kirjassa Johnston 2012, NRC 2006). C-

vitamiini osallistuu myös monien hormonien, kuten kalsitoniinin, hypotalamuksen tuottama kasvuhormonia vapauttava somatoliberiinin (GHRH) sekä aivolisäkkeen etulohkon erittämä tyreotropiinin eli tyrotropiinin (TSH) synteesiin ja aktivaatioon (Bousquet-Moore ym. 2012, NRC 2006). C-vitamiini toimii katalysaattorina eli nopeuttaa kemiallisia reaktioita kulumatta itse reaktiossa monissa biologisissa reaktioissa ja sitä tarvitaan glukoosin normaali-metaboliaan (NRC 2006, Johnston ym. 2001). C-vitamiinia soluun kuljettava Na^+ ja $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -riippuvaista kuljettajaproteiinia esiintyy laajalti metabolisesti aktiivisissa ja erilaistuneissa kudoksissa, kuten osteoblasteissa (Godoy ym. 2007).

C-vitamiinia tarvitaan ruston ja luun kasvuun, C-vitamiinin puutteen aiheuttaen ruston ja luun haurastumista. C-vitamiinin puutoksessa havaitaan heikentynyttä kollageenirakennetta sekä kudosten liian pientä karnitiinipitoisuutta, mitkä ilmenevät muutoksina kasvulevyillä luiden epifyyseissä ja metafyyseissä (Johnston 2012). Askorbiinihappo on oleellinen hypertrofisten kondrosyyttien kypsymiselle, vaikkakaan tarkkaa mekanismia ei vielä tiedetä (Hall 2015). Luumuutokset kuitenkin korjautuvat nopeasti C-vitamiinilisän myötä (Vitale ym. 2009, Karthiga ym. 2008). Joitakin tapauksertomuksia julkaistu liittyen koirilla esiintyneisiin C-vitamiinin puutostiloihin sekä C-vitamiinilisän vaikutuksista hypertrofiseen osteodystrofiaan (*hypertrophic osteodystrophy*, *HOD*) sekä lonkkanivelen kasvuhäiriöön (NRC 2006, Belfield 1976, Meir ym. 1957). C-vitamiinilisän on raportoitu nostavan plasman C-vitamiinipitoisuutta ja lisäävän nivelruston määrää beagleilla, joille on kirurgisesti aiheutettu nivelrikko (Schwartz 1980).

Liiallisen C-vitamiinin saannin on todettu rotilla lisäävän E-vitamiinin tarvetta, jotta oksidatiiviselta stressiltä välttyttäisiin (Chen 1981). Myös ihmisellä on havaittu korkeiden C-vitamiini annosten aiheuttavan haitallisia oksidatiivisia vaikutuksia (Childs ym. 2001, Podmore ym. 1998). C-vitamiinilla on taipumus kertyä elimistössä tiettyihin soluihin ja kudoksiin, kuten aivolisäkkeeseen, missä sen pitoisuus esimerkiksi ihmisellä on noin kolminkertainen verrattuna muihin kudoksiin (Johnston 2012).

Koira kykenee itse syntetisoimaan C-vitamiinia maksassaan jo alle viikon ikäisestä eivätkä näin ollen tarvitse C-vitamiinia ravinnosta, minkä takia kaupallisiin koiranruokiin ei lisätä C-vitamiinia (NRC 2006, Nandi ym. 1997, Chatterjee 1979, Chatterjee ym. 1975). Kuitenkin on todettu, että koirat syntetisoivat C-vitamiinia hitaammin kuin muut C-vitamiinia itse syntetisoivat lajit (Chatterjee ym. 1975). C-vitamiinin tarve voi kuitenkin lisääntyä stressaavissa ja kovaa fyysistä rasitusta käsittävissä tilanteissa, jolloin koiran maksan C-vitamiinisynteesi on riittämätön (NRC 2006). Vieroittamattomat koiranpennut saavat C-vitamiinia nartun maidosta,

sillä nartun maito sisältää C-vitamiinia noin neljä kertaa enemmän veren C-vitamiinipitoisuuteen verrattuna (NRC 2006).

2.1.2.2.3 Makrokivennäiset

Kalsium ja fosfori. Elimistössä ollessaan kalsium on 99 prosenttisesti sitoutuneena luustoon kalsiumhydroksiapatiitina ja loppu elimistössä olevasta kalsiumista on joko plasmassa tai soluvälinesteessä joko sitoutuneena tai vapaassa ionisoituneessa muodossa (Sjaastad ym. 2010). Solun ulkoisen kalsiumin konsentraatiota säädellään tarkoin kalsiotrooppisten hormonien D-vitamiinin, parathormonin ja kalsitoniinin kautta (Sjaastad ym. 2010).

Kalsiumin tarpeeseen ja hyödynnettävyyteen vaikuttavat koiran ikä, rotu ja ruokavalio. Kalsiumin tarve on suurimmillaan luiden ja hampaiden muodostuessa sekä kasvaessa (NRC 2006). Tiineyden aikana nartun kalsiumin ja fosforin tarve kasvaa viimeisellä kolmanneksella jopa 60 prosentilla sikiöiden luustonkasvun takia (Hand ym. 2010). Maidontuotannon korkeimmassa vaiheessa, pentujen ollessa noin neljän viikon ikäisiä emo tarvitsee kaksinkertaisesti, jopa viisinkertaisesti, kalsiumia ei-tiineeseen narttuun verrattuna (Hand ym. 2010). Ravinnosta tarvittavan kalsiumin määrään vaikuttaa erittyvän maidon määrä, mihin puolestaan vaikuttaa pentuekoko (Hand ym. 2010). Kolostrumin kalsiumpitoisuus on suuri, mutta maidon kalsiumpitoisuus kuitenkin laskee hetkellisesti parin kolmen päivän kuluttua jopa alhaisemmiksi kuin niin sanotussa kypsässä maidossa (Hand ym. 2010). Kalsiumin ja fosforin pitoisuudet maidossa ovat koirarotujen välillä erittäin samanlaiset, ja kalsium/fosfori -suhde pysyy samana (1,3:1), vaikka kalsiumin ja fosforin määrä kasvaa imeytyksen edetessä (Hand ym. 2010). Voidaan ajatella, että nartun maidossa olevat runsaat määrät kalsiumia ja fosforia olisivat suorana suosituksena myös kasvavilla, jo vieroitetuilla pennuilla, huolimatta siitä, että luuston kalsifioituminen ei tapahdu yhtä nopeasti kuin kehon koon kasvu vieroituksen jälkeen (Hand ym. 2010, Baines 1981).

Kasvavan koiran suolistosta kalsiumin imeytyminen elimistöön riippuu ravinnosta saatavan kalsiumin määrästä. NRC (2006) mukaan koirilla kalsiumin hyödynnettävyys vähenee kasvun aikana, ja jos kalsiumia saadaan ravinnosta liikaa. Yleisesti ottaen pH:n lasku näyttää lisäävän kalsiumin ja magnesiumin imeytymistä vaikuttamatta fosforin imeytymiseen ohutsuolen loppuosasta sekä paksusuolesta (Beynen ym. 2001, 2002). Kasvun aikainen luiden pehmeneminen eli niin kutsuttu riisitauti johtuu riittämättömästä mineraalien, lähinnä kalsiumin saannista, mutta on hyvä huomioda, että ainakin osa kalsiumin imeytymisestä on D-vitamiinista riippuvaista (katsauksessa Land & Schoenau 2008, Prenticer 2006). Riisitaudista puhutaan vielä

kasvavien yksilöiden kohdalla, sillä muutokset ilmenevät vain ennen kasvulevyjen sulkeutumista. Riisitaudissa pitkien putkiluiden kasvulevyjen kalsifikaatio epäonnistuu, jolloin havaitaan tyypillisiä luuston epämuodostumia (Land & Schoenau 2008, Prenticer 2006). Lisäksi kalsiumin puute aiheuttaa nutritionaalista sekundaarista hyperparatyroidismia, joka kroonistuessaan aiheuttaa luiden kalsiumpitoisuuden alenemista ja haurastumista sekä mahdollisesti siitä johtuvia murtumia (Hand ym. 2010, NRC 2006).

Myös kalsiumin liikasaanti lisää kasvuhäiriöiden todennäköisyyttä suuri- ja jättirotuisten koirarotujen pennuilla, mikä on otettu huomioon pennuille tarkoitetuissa kaupallisissa täysravinnoissa kalsiumin ja fosforin määrissä ja suhteessa (Greco 2014, Schoenmakers ym. 2000). Kalsiumin liikasaannin on havaittu kasvavilla suuri- ja jättirotuisilla koiranpennuilla aiheuttavan osteokondroosimuutoksia, hidastunutta ruston muuntumista luuksi kasvun aikana, luiden normaalia suurempaa mineraalipitoisuutta, varttinäluiden vääntymistä sekä kasvun hidastumista (NRC 2006, Slater ym. 1992, Nap ym. 1993, Hazelwinkel ym. 1991, Hazelwinkel ym. 1985, Hedhammar ym. 1974).

Kuten kalsium myös fosfori on elimistössä suurimmaksi osaksi sitoutuneena luustoon, ja sen homeostasia kulkee käsikädessä kalsium säätelyn kanssa (Sjaastad ym. 2010, NRC 2006). Ravinnon kalsium-fosforisuhteen tulisi olla vähintään 1:1, mutta jopa 1,5:1 ja vastaavasti tiineyden viimeisen kolmanneksen ja laktaation aikana ravinnon kalsium-fosforisuhteeksi suositellaan vähintään 1,1:1, mutta jopa 2:1 (Hand ym. 2010, NRC 2006). Ravinnon korkean kalsiumpitoisuuden tiedetään heikentävän fosforin imeytymistä (Schoenmakers ym. 1999, Jenkins & Phillips 1960b). Viljoista ja joistakin kasveista peräisin oleva fylaatti, joka on huomattavasti huonommin hyödynnettävissä kuin muut fosforimuodot, heikentää kalsiumin hyödynnettävyyttä koiralla (NRC 2006, Hoff-Jørgensen 1945, Erdman 1979). Fosforin puute aiheuttaa koiran pennuilla kasvun hidastumista ja jopa pysähtymistä, huonontunutta ruokahalua sekä eturaajojen taipumista (Jenkins & Phillips 1960b). Vastaavasti fosforin liikasaannista koirilla ei ole tutkittua tietoa (NRC 2006).

Magnesiumista noin 50 prosenttia elimistön kokonaismagnesiumista on sitoutuneena luustossa, missä se on tärkeä osa luiden ja hampaiden mineraalirakennetta, minkä lisäksi magnesiumilla monia muita tärkeitä tehtäviä elimistössä (NRC 2006). Magnesium muun muassa toimii elimistössä kofaktorina monissa synteeseissä, stabiloi niin solun sisäisiä kuin ulkoisia rakenteita, osallistuu solujen väliseen viestintään sekä on välttämätön monien hormonien, kuten parathormonin, erittymisessä ja toiminnassa (NRC 2006, Khanna ym. 1998). Kempen ym. 2010 kirjoittamassa kirjassa mainitaan, että lopputiineyden aikana nartun magnesiumin tarve kasvaa,

ja se voi jopa kolminkertaistua lopputiineyden aikana. Magnesiumin puutoksessa koiranpennuilla on havaittu ranteiden yliojentumisen ja takajalkojen halvausoireiden lisäksi ruokahaluttomuutta ja painonlaskua sekä rinta-aortan mineralisaatiota (Stahlman ym. 2000, Bunce ym. 1962a, Vitale ym. 1961). Ruuansulatuskanavan pH:n lasku näyttää lisäävän magnesiumin ja kalsiumin imeytymistä vaikuttamatta fosforin imeytymiseen (Beynen ym. 2001, 2002). Fosforin liikasaannin tiedetään pahentavan magnesiumin puutteen kliinisiä oireita (Bunce ym. 1962a). Koirilla ei ole havaittu haittavaikutuksia magnesiumin liikasaannista (NRC 2006).

2.1.2.2.4 Mikrokipennäiset eli hivenaineet

Kuparia ei juurikaan ole kudoksissa, vaan suurin osa elimistön kuparista on maksassa sitoutuneena metalloproteiineihin (Prohaska 2012, Bousquet-Moore ym. 2010). Kupari on olennainen osatekijä entsyymeissä, jotka katalysoivat oksidatiivisia reaktioita sekä on suuressa roolissa sidekudoksen muodostumisessa ja rakenteessa (Prohaska 2012, Hand ym. 2010, Kagan & Li 2003, NRC 2006). Kupari auttaa myös suojautumaan oksidatiivista stressiä vastaan (Prohaska 2012, Hand ym. 2010). Kupari osallistuu tyrosinaasientsyymin kautta melaniinipigmentin tuotantoon, mitä kautta kuparin puutos aiheuttaa hypopigmentaatiota (Prohaska 2012, Uauy ym. 1998, Zentek & Meyer 1991).

Sikiö on täysin riippuvainen maternaalisesta kuparista, minkä takia emon kuparin määrä elimistössä nousee tiineyden aikana (Prohaska 2012, Uauy ym. 1998). Ennen syntymää sikiö alkaa varastoida maksaansa ja aivoihinsa kuparia, sillä syntymän jälkeen yksilö harvoin saa ravinnostaan riittävästi kupari nopean kasvun vaiheeseen (Prohaska 2012, Uauy ym. 1998). Niin tiineyden kuin laktaation aikana nartun kuparintarve nousee suhteettomasti kasvavan energiantarpeen myötä (Hand ym. 2010). Tiedetään, että rotilla laktaation aikana emon kuparin tarve kasvaa, sillä kuparia erittyy maitoon runsaasti (Donley ym. 2002). Kuparin puutteesta kärsivillä jälkeläisillä havaitaan karvan pigmentin vähänemistä, distaalisten varvasluiden yliojentumista sekä pahimmassa tapauksessa normokromista ja normosyyttistä anemiaa (Hand ym. 2010, Zentek & Meyer 1991). Kuparin puutteesta aiheutuu ihmisvauvoille luumuutoksia, jotka muistuttavat C-vitamiinin puutteesta aiheutuvia muutoksia, kuten osteoporoosia, luun murtumia, osteofyyttien eli luupiikkien muodostumista sekä luukalvonalaista uudisluun muodostusta (Prohaska 2012, Uauy ym. 1998). Kuparin puutteen ei kuitenkaan esimerkiksi hevosella ole todettu olevan osteokondroosin taustalla (Laverty & Girard 2013). Kuparin hyötyosuutta heikentää sinkin ja raudan runsas saanti samanaikaisesti, mutta kasviperäiset fytaatit eivät juurikaan vaikuta kuparin imeytymiseen (NRC 2006). Kuparin tiedetään olevan

koirille toksista suurina pitoisuuksina, etenkin osalle koiraroduista (NRC 2006). Koirien kuivamuonat täydennetään lähes aina kuparilisillä (NRC 2006).

Sinkkiä esiintyy lähes kaikissa kudoksissa, mutta pieniä määriä (NRC 2006). Sinkkiä tarvitaan useissa elimistön katalyyttisissä, rakenteellisissa ja säätelevissä prosesseissa ja reaktioissa (kirjassa Holt ym. 2012, Tuerk & Fazel 2009, Cousins ym. 2006). Sinkki yksin ja yhdessä muiden mikrokivennäisten kanssa toimii kofaktorina ja katalysaattorina useille entsyymille, jotka osallistuvat muun muassa solun jakautumiseen sekä proteiini- ja hiilihydraattimetaboliaan (Stefanidou ym. 2006, Clegg ym. 2005, McCall ym. 2000). Sinkin puutos näkyy joka puolella elimistössä (Tuerk & Fazel 2009). Sinkin puute voi olla perinnöllistä tai hankittua (Holt ym. 2012). Sinkin puutos vaikuttaa kasvuun sitä heikentävästi (Holt ym. 2012). Sinkin puutoksen taustalla voi myös olla ravinnon korkea fytaattipitoisuus (Tuerk & Fazel 2009). Yleisesti ottaen, kun kudosta tuotetaan normaalia enemmän, kuten tiineyden, laktaation ja kasvun aikana, on yksilö alttiimpi sinkin puutokselle (Hand ym. 2010). Nartun sinkin tarve lisääntyy laktaation aikana, sillä sinkkiä erittyy maitoon runsaasti (Kempe ym. 2010).

Mangaania on hyvin pieninä pitoisuuksina elimistössä erityisesti metabolisesti aktiivisissa elimissä ja luustossa, mutta silti se on tärkeässä osassa entsyymien kofaktoreina ja osana metalloentsyymeissä sekä normaalissa ruston ja luun kehityksessä (kirjassa Nielsen 2012, Hand ym. 2010, NRC 2006, Leach & Harris 1997). Joidenkin entsyymien kohdalla magnesium voi korvata mangaanin (Nielsen 2012). Koirilla mangaanin imeytyminen ja tarve perustuvat muilla eläinlajeilla tehtyihin tutkimuksiin (NRC 2006). Mangaanin imeytymistä parantavat L-histidiini ja sitraatti sekä raudan ja magnesiumin puute, kun taas liiallisen raudan-, kalsiumin-, fosforin ja koboltin (B₁₂-vitamiinin osa) saannin tiedetään heikentävän mangaanin imeytymistä (Hand ym. 2010, NRC 2006, Aschner & Aschner 2005, katsauksessa Finley 2004). Mangaanin puutos on saatu aikaan useilla eläinlajeilla (Nielsen 2012). Useilla eri eläinlajeilla on kasvuaikana havaittu hidastunutta luiden kasvua etenkin eturaajoissa ja etujalkojen taipumista, ja vastaavasti aikuisilla ontumista ja suurentuneita niveliä sekä heikentyntä liikkumista todennäköisesti johtuen endokondraalisen osteogeenesisin inhibitiosta. Koiralla ei kuitenkaan ole tutkittu mangaanin puutoksen vaikutuksia (NRC 2006). Yhdessä A-vitamiinin liikasaannin kanssa mangaanin puute aiheuttavat kasvulevyn soluväliaineen heikentymistä ja hajoamista, joka pahimmillaan aiheuttaa kasvulevyjen ennenaikaisen sulkeutumisen (Carlson & Weisbrode 2012). NRC (2006) mukaan koirilla ei ole myöskään raportoitu mangaanin liikasaantia, eikä ylärajaa tiedetä.

Boori osallistuu moneen elimistön biokemialliseen reaktioon, kuten luun kasvuun ja muodostukseen (Nielsen 2012). Boorin puute oletettavasti heikentää insuliiniherkkyyttä, ja

vastaavasti lisää D-vitamiinin tarvetta kanoilla ja rotilla (Hunt 2008, katsauksessa Nielsen 2008). Kanoilla boorin puute hidastaa kasvua vaikuttamalla kasvulevyjen kypsymiseen, ja saa aikaan D-vitamiinin puutteesta kärsivillä kanoilla plasman alkalisen fosfataasin nousua (Nielsen 2008). Rotilla vastaavasti boorin oletetaan vaikuttavan parathormonin toimintaan sekä epäsuorasti kalsiumin, fosforin ja magnesiumin sekä D-vitamiinin metaboliaan ja näin ollen myös luumetaboliaan (Nielsen 2008). Koirilla ei ole tehty tutkimuksia boorin saantisuosituksiin liittyen (NRC 2006).

Piitä on erityisesti sidekudoksessa, kuten jänteissä, rustossa ja luussa (Carlisle 1997). Piitä ei nykytiedon valossa pidetä välttämättömänä ravintoaineena niin sanotuille korkeammille eläimille, kuten nisäkkäille (Nielsen 2012). Kuitenkin piin vähäinen saanti aiheuttaa erinäisiä fysiologisia ja biokemiallisia muutoksia nisäkkäiden kudoksissa (Nielsen 2012). Pii on tärkeässä roolissa luiden kalsifioitumisessa ja maturaatiossa, tehostaen luiden kalsifioitumista kasvuvaiheessa, jolloin luiden piipitoisuus on korkeimmillaan (NRC 2006). Kanoilla piin puutteen on havaittu aiheuttavan muutoksia luun rakenteeseen ja vahvuuteen, sekä vaikuttavan kollageenin muodostumiseen rusto- ja luukudoksessa (Nielsen 2012, Carlisle 1997). Vastaavasti rotilla on myös havaittu muutoksia kollageenimetaboliassa, luiden rakenteissa ja vahvuudessa (Nielsen 2012, Carlisle 1997) sekä normaalia kapeampia kasvulevyjä ja rustosolujen esiintymistä normaalia tiheämmin (Jugdaohsingh ym. 2008). Pii näyttää myös vaikuttavan osteoblastien ja osteoklastien geeniekspressioon hiirillä (Maehira ym. 2009). Pii vaikuttaa muiden mineraalien, kuten kuparin, raudan ja magnesiumin, imeytymiseen ja käyttöön elimistössä (Nielsen 2012). NRC (2006) mukaan koirille ei ole olemassa saantisuosituksia piille.

3 Pohdinta

En varmaan koskaan lakkaa ihmettelemästä sitä, kuinka endokondraalisessa luutumisessa rustokudos muuntuu hallitusti luukudokseksi yksilön kasvaessa niin monien eri molekyylien, solujen, välittäjäaineiden ja hormonien osallistuessa tapahtumaketjuun. Esimerkiksi se kuinka lähes samanaikaisesti muodostuvat rustokanavat ja niihin kasvavat verisuonet ovat vain tietyssä hetkellisessä kasvunvaiheessa, niin sanotussa 'aikaikkunassa' (Olstad ym. 2015, Ytrehus ym. 2007), lopulta mahdollistaen rustokudoksen muuntumisen luukudokseksi, on suunnattoman kiehtovaa.

Osteokondroosin esiintyminen nopeasti kasvaviksi jalostetuilla eläinlajeilla ja roduilla, kertoo sen ainakin osittaisesta perinnöllisestä taustasta. Perinnöllisyys vaikuttaa myös yksilön aikuiskokoon ja kasvuvauhtiin, joten nopeasti kasvamaan jalostettujen lajien ja rotujen

todennäköisyys sairastua on myös oletettavasti suurempi. Myös se, että osteokondroosia tavataan kaikilla nisäkkäillä, mukaan lukien ihmisellä, enemmän uros- kuin naaraspuolisilla yksilöillä, kertoo ainakin osittaisesta osteokondroosin perinnöllisyydestä ja nopeakasvuisuuden altistavasta vaikutuksesta. Sukupuolijakauman taustalla voisi myös ajatella olevan hormonaalisia tekijöitä, joita eri sukupuolta olevien luustonkehityksessä on muutenkin havaittu (Prenticer 2006). Sairauden ainakin osittaisen perinnöllisyyden huomioiden, jän pohtimaan tiettyjen rotujen, kuten tanskandoggien ja labradorinnoutajien, käyttöä tutkimuksissa ja sen mahdollisesti aiheuttamaan vääristymää tutkimustuloksissa. Lisäksi osa tutkimuksista on tehty hyvinkin pienillä aineistoilla ja osa artikkeleista on varsin vanhoja, mikä osaltaan voi vaikuttaa tutkimuksissa käytettyihin tutkimusmenetelmiin ja sitä kautta tutkimusten tuloksiin. Myös se, että varsin monessa ruokintavirheessä luustonmuutokset ovat ainakin osittain toisiaan muistuttavia, kertoo mielestäni siitä, että tutkimuksissa ei aina olla otettu huomioon ravintoaineiden yhteisvaikutuksia ja esimerkiksi suoliston pH:n vaikutusta ravintoaineiden imeytymiseen.

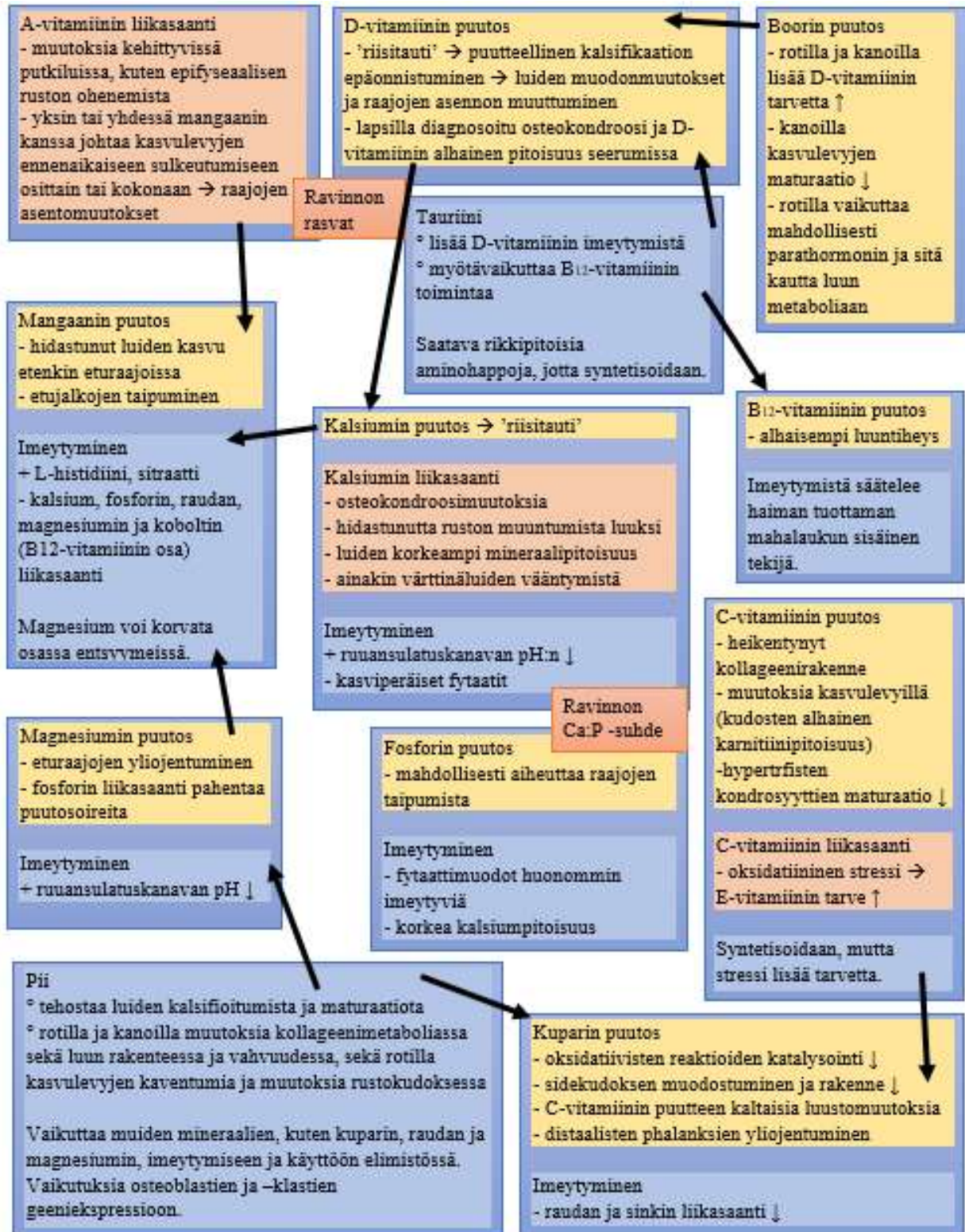
Osteokondroosin tiedetään sioilla ja hevosilla johtuvan mineralisoituneeseen rustoon tunkeutuvan verisuonituksen epäonnistumisesta ja paikallisesta nekroosista. Osteokondroosin etiologian ajatellaan olevan sama eri eläinlajeilla. Olstadin ym. katsauksessaan (2015) esittämään kysymykseen, mikä aiheuttaa verisuonituksen paikallisen nekrotisoitumisen, ei olla tutkimuksissa vielä löydetty vastausta. Voivatko rustokanavat ikään kuin 'painua kasaan' ja samalla niissä olevat verisuonet vaurioitua liiallisesta mekaanisesta rasituksesta ja siten saaden aikaan osteokondroottisia muutoksia? Koiran luusto ei mahdollista liikkumista heti syntymän jälkeen, ja on vielä suhteellisen pitkään hyvin rustoinen, ja koiralla endokondraalinen luutuminen päättyy karkeasti vasta aikuisuuden kynnyksellä ja luustollinen kypsyminen on hitaampaa suuri- ja jättikokoisilla koiraroduilla. Alle kolmen kuukauden ikäisillä koiranpennuilla tehdyn tutkimuksen mukaan portaiden kävely lisää lonkkadysplasiariskiä, kun taas liikkuminen vapaana pehmeällä alustalla vähentää riskiä (Krontveit ym. 2012). Lisäksi ihmisillä osteokondroosin puhkeamisen taustalla pidetään nykytiedon mukaan liiallisesta rasituksesta toistuvasti aiheutuvaa mikrotraumaa (Maier ym. 2016). Näin ollen voidaan ajatella rustoisen luuston olevan altis mekaaniselle rasitukselle hyvinkin pitkään ja sitä kautta mahdollisesti olevan altis myös osteokondraalisten muutosten kehittymiselle, unohtamatta mahdollisen ylipainon vaikutusta kehittyvään luustoon. Olisi mielenkiintoista perehtyä tarkemmin kuinka fyysinen rasitus, kuten portaiden kävely, liikkuminen kovalla alustalla tai lenkittäminen liian varhaisella iällä, vaikuttavat kasvavan koiranpennun luustoon.

Geenien ilmentymiseen vaikuttaa yksilön ympäristön lisäksi suuressa määrin yksilön saama ravinto. Ajatellaan, että pennun ruokinta tasapainotetulla kaupallisella täysruualla tarjoaa pennulle kaikki normaaliin kasvuun ja kehitykseen tarvittavat pääravintoaineet, vitamiinit ja kivennäisaineet (Greco 2014). Ravitsemukselliset puutosten ajatellaan nykyään olevan harvinaisia koiranpennuilla, jotka syövät tasapainotettua kaupallista penturuokaa, ja näin ollen todennäköisempänä pidetään ravintoaineiden liikasaantia (Richardson & Zentek 1998, Richardson & Toll 1997). Huomion arvoista on kuitenkin se, että vaikka pennut pääsääntöisesti ruokitetaan tasapainotetuilla kaupallisilla penturuuilla, ei kasvuhäiriöiden esiintyvyys juurikaan ole laskenut (Richardson & Zentek 1998). Vielä ei kuitenkaan tarkkaan tiedetä, millainen ravinto tukee parhaalla tavalla luuston kehitystä ja kasvua. Kuitenkin on näyttöä siitä, että ravinnolla on merkitystä luiden kehitykseen aina kohdusta kasvulevyjen sulkeutumiseen saakka (Prenticer 2006). Voisiko osteokondroosin taustalla olla jonkin ravintoaineen tai joidenkin ravintoaineiden puutos ja/tai liikasaanti, joka molekyyl- ja solutasolla aiheuttaa haurautta rustokudoksessa, jolloin myös kudokseen muodostuvat rustokanavat ja verisuonitus joutuvat normaalia voimakkaamman mekaanisen rasituksen kohteeksi liikunnan määrän ja rasittavuuden ollessa vielä niin sanotusti normaalia? Entä voidaanko osteokondroosin puhkeamiseen vaikuttaa ravinnolla, jota yksilö syö? Ja koska luustonkehitys ja -kasvu alkavat jo sikiökaudella, voidaanko sairauden puhkeamiseen vaikuttaa jo ennen yksilön syntymään emon syömän ravinnon kautta?

Seuraavalle sivulle on koottu (kuva 8) eri ravintoaineiden puutosten ja liikasaannin yksin tai yhdessä muiden ravintoaineiden kanssa aikaansaamia kehittyvässä luustossa nähtäviä muutoksia, jotka voisivat olla osa osteokondroosin etiologiaa.

Osteokondroosi etiologia on edelleen hämärän peitossa, joskin etiologia on, niin kuin jo aiemmin mainittu, monisyinen (Accadled ym. 2017, Juergen ym. 2017, Krause ym. 2015, Olstad ym. 2015). Se kuinka varhaiset osteokondraaliset muutokset voivat parantua jopa kokonaan riippuen muutoksen laajuudesta, kuvastaa mielestäni sitä, kuinka muutoksen aiheuttajan ollessa poissa, on elimistöllä mahdollista korjata vaurio, etenkin jos perinnölliset tekijät, luuston anatomia huomioden, ovat kunnossa. Näin ollen kirjallisuuden perusteella mahdollisen jatkotutkimuksen hypoteesiksi asettaisin osteokondraalisen muutoksen aiheuttajaksi ravitsemuksellisen tekijän, joka yhdessä mekaanisen rasituksen saa aikaan osteokondraaliset muutokset. Erityisen mielenkiintoista olisi selvittää osteokondroosin ja D-vitamiinin puutoksen yhteyttä koirilla. Ja mahdollisesti myös selvittää näiden koirien tauriinin saantia. Lisäksi olisi mielenkiintoista tutkia tarkemmin terveiden koirien ja osteokondroosidiagnoosin saaneiden C-vitamiinin saantia. Esimerki lisääntykö pennun C-vitamiinin tarve stressaavissa tilanteissa ja onko pennun oma C-

vitamiinin tuotanto tällöin riittävää ja kuinka suuri vaikutus tällä on mahdollisesti luuston kasvuun ja kehitykseen.



Kuva 8. Ravintoaineiden puutoksen tai liikaasaannin vaikutuksia kasvuikäiseen luustoon.

Lähteet

Accadbled F, Vial J, Sales de Gauzy J. Osteochondritis dissecans of the knee – Review article. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research* 2017; 104(1): S97-S105.

Alini M, Marriott A, Chen T. A novel angiogenic molecule produced at the time of chondrocyte hypertrophy during endochondral bone formation. *Developmental Biology* 1996; 176(23): 124-132.

Armas LAG, Hollis BW ja Heaney RP. Vitamin D₂ is much less effective than Vitamin D₃ in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004; 89: 5387-5391.

Baines FM. Milk substitutes and the hand rearing of puppies and kittens. *Journal of Small Animal Practice* 1981; 22: 555-578.

Ballock RT, Reddi AH. 1994. Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. *Journal of Cell Biology* 1994; 136(31): 1311-1318.

Batt RM, Horadagoda NU, McLean L, Morton DB, Simpson KW. Identification and characterization of a pancreatic intrinsic factor in the dog. *American Journal of Physiology* 1989; 256: G517-G523.

Batt RM, Horadagoda NU. Gastric and pancreatic intrinsic factor-mediated absorption of cobalamin in the dog. *American Journal of Physiology* 1989; 257: G344-G349.

Belfield WO. Chronic subclinical scurvy and canine hip dysplasia. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician* 1976; 71: 1399-1403.

Beynen AC, Baas JC, Hoekemeijer PE, Kappert HJ, Bakker MH, Koopman JP, Lemmens AG. Faecal bacterial profile, nitrogen excretion and mineral absorption in healthy dogs fed supplemental oligofructose. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2002; 86: 298-305.

Beynen AC, Kappert HJ, Yu S. Dietary lactulose decreases apparent nitrogen absorption and increases apparent calcium and magnesium absorption in healthy dogs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2001; 85: 67-72.

Biourge V, Sergheraert R. Hair pigmentation can be affected by diet in dogs. Proceedings of the Comparative Nutrition Society, Kirk-Baer 2002; 4: 103-104.

Boskey AL, Blank RD, Doty SB. Vitamin C-sulfate inhibits mineralization in chondrocyte cultures: a caveat. Matrix Biology 2001; 20: 99-106.

Bousquet-Moore D, Mains RE, Eipper BA. Peptidylglycine alpha-amidating mono-oxygenase and copper: a gene-nutrient interaction critical to nervous system function. Journal of Neuroscience Research 2010; 88(12): 2535-2545.

Bruns J, Werner M, Habermann C. Osteochondritis dissecans: Etiology, pathology, and imaging special focus on the knee joint – Review article. Cartilage 2017; 00: 1-17.

Bunce GE, Jenkins KJ, Phillips PH. The mineral requirements of the dog. 3. The magnesium requirement. The Journal of Nutrition 1962a; 76: 17-22.

Burns RA, Lefaivre MH, Miller JA. Effects of dietary protein quantity and quality on the growth of dogs and rats. Journal of Nutrition 1982; 112: 1843-1853.

Carlisle EM. Silicon. Teoksessa: O'Dell BL ja Sunde RA (toim.) Handbook of Nutritionally Essential Minerals. Marcel Dekker, New York 1997: 603-618.

Carlson CS, Meuten DJ, Richardson DC. Ischemic necrosis of cartilage in spontaneous and experimental lesions of osteochondrosis. Journal of Orthopaedic Research 1991; 9: 317-329.

Carlson CS, Weisbrode SE. Bones, Tendons and Ligaments. Teoksessa: Zachary JF, McGavin MD (toim.) Pathology Basis of Veterinary Disease. 5. p. Elsevier Inc., Missouri 2012: 921-945.

Case LP, Czarnecki-Maulden GL. Protein requirements of growing pups fed practical dry-type diets containing mixed-protein sources. American Journal of Veterinary Research 1990; 51: 808-812.

Chatterjee IB, Majumder AK, Nandi BK, Subramanian N. Synthesis and some major functions of vitamin C in animals. Annals of the New York Academy of Sciences 1975; 258: 24-47.

Chatterjee IB. Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. Nature 1979; 182(4118): 1271-1272.

Chen LH. An increase in vitamin E requirement induced by high supplement of vitamin C in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1981; 34: 1036-1041.

Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise 2001; 31: 745-753.

Cho DY, Frey RA, Guffy MM, Leipold HW. Hypervitaminosis A in the dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1975; 36(11): 1597-1603.

Clegg MS, Hanna LA, Niles BJ, Momma TY, Keen CL. Zinc deficiency-induced cell death. *IUBMB Life* 2005(10); 57: 661-669.

Cole AA, Wezeman FH. Perivascular cells in cartilage canals of the developing mouse epiphysis. *The American Journal of Anatomy* 1985; 174: 119-129.

Cousins RJ, Liuzzi JP, Lichten LA. Mammalian zinc transport, trafficking and signals. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281(34): 24085-24089.

Craig PH, Riser WH. Osteochondritis dissecans in the proximal humerus of the dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 1965; 6(1): 40-49.

Daemmrich K. Relationship between nutrition and bone growth in large and giant dogs. *The Journal of Nutrition* 1991; 12: S114-S121.

DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 1991; 64: 849-859.

Deckers MM, Van Beek ER, Van Der Pluijm G, Wetterwald A, Van DerWeePals L, Cecchini MG, Papapoulos SE, Lowik CW. Dissociation of angiogenesis and osteoclastogenesis during endochondral bone formation in neonatal mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 2002; 17: 998-1007.

Delaney SJ, Hill AS, Backus RC, Czarnecki-Maulden GL, Rogers QR. Dietary crude protein concentration does not affect the leucine requirement of growing dog. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2001; 85: 88-100.

Delgado-Beaza E, Nieto-Chagvaceda A, Miralles-Flores C, Santos-Alvarez I. Cartilage canal growth: experimental approaches in the rat tibia. *Acta Anatomica* 1992; 145: 143-148.

Dirckx N, Van Hul M, Maes C. Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration. *Birth Defects Research Part C* 2013; 99: 170-191.

Dloniak SM, French JA, Holekamp KE. Rank-related maternal effects of androgens on behaviour in wild spotted hyenas. *Nature* 2006; 440(7088): 1190-1193.

Dobenecker B, Endres V, Kienzle E. Energy requirements of puppies of two different breeds for ideal growth from weaning to 28 weeks of age. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2013; 97: 190-196.

Donley SA, Hagan BJ, Rim H, Linder MC. Copper transport to mammary gland and milk during lactation in rats. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2002; 283(4): E667-E675.

Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH (toimittaneet). *Present Knowledge in Nutrition*. 10. p. International Life Sciences Institute Wiley-Blackwell, Iowa, West Sussex, Oxford 2012: 199-201, 207-208, 248, 250-251, 343, 391, 521, 525-528, 532-533, 587-588, 591-593, 598-599.

Erdman JW. Oilseed phytates: Nutritional implications. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1979; 56(8): 736–741.

Finley JW. Does environmental exposure to manganese pose a health risk to healthy adults? *Nutrition Reviews* 2004; 62: 148-152.

Garrard G, Harrison GA, Weiner JS. Genotypic differences in the ossification of 12-day old mice at 23°C and 32°C. *Journal of Anatomy* 1974; 117: 531-540.

Gartland A, Mason-Savas A, Yang M, MacKay CA, Birnbaum MJ, Odgren PR. Septoclast deficiency accompanies postnatal growth plate chondroplasia in the toothless (tl) osteopetrotic, colony-stimulating factor-1 (CSF-1) -deficient rat and is partially responsive to CSF-1 injections. *American Journal of Pathology* 2009; 175: 2668-2675.

Gazet JC, McColl I. Absorption of vitamin B₁₂ from the small intestine. Study in man, monkey, cat, and dog. *British Journal of Surgery* 1967; 54: 128-131.

Gietzen DW. Neural mechanism in the responses to amino acid deficiency. *The Journal of Nutrition* 1993; 123: 610-625.

Godoy A, Ormazabal V, Moraga-Cid G, Zúñiga FA, Sotomayor P, Barra V, Vasquez O, Montecinos V, Mardones L, Guzmán C, Villagrán M, Aquayo LG, Oñate SA, Cárcamo JG, Rivas CI, Vera JC. Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of ascorbic acid transporter SVCT. Activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(1): 615-624.

Greco DS. Pediatric nutrition. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2014; 44: 265–273.

Haines RW. The evolution of epiphyses and of endochondral bone. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 1942; 17: 267-292.

Hall BK. Vertebrate Skeletal Tissue; Bone; Vertebrate Cartilages; Chondrocyte Diversity; Growth and Morphogenesis of Long Bones. *Teoksessa: Bones and Cartilage - Developmental and Evolutionary Skeletal Biology*. 2. p. Academic Press Elsevier, Oxford 2015: 4-5, 7, 14-15, 23, 28, 43, 46-49, 68, 255-256, 374-381, 487-488. 491-492, 496-498, 501, 508-510.

Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL, Roudebush P, Novotny BJ. Feeding Reproducing Dogs; Feeding Nursing and Orphaned Puppies from Birth to Weaning; Feeding Growing Puppies: Postweaning to Adulthood; Developmental Orthopedic Disease of Dog. *Teoksessa: Small Animal Clinical Nutrition*. 5. p. Mark Morris Institute, Kansas. 2010: 108, 120, 281-288, 290, 297-304, 311-315.

Hazewinkel HAW, Tryfonidou MA. Vitamin D₃ metabolism in dogs. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002; 197: 23-33.

Hazewinkel HAW, van den Brom WE, Van 'T Klooster AT, Voorhout G, Van Wees A. Calcium metabolism in Great Dane dogs fed diets with various calcium and phosphorus levels. *The Journal of Nutrition* 1991; 121(11): S99–S106.

Hazewinkel, HAW Goedegebuure, SA Poulos, PW Wolvekamp, WTC. Influences of chronic calcium excess on the skeletal development of growing Great Danes. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1985; 21: 377-391.

Heaney RP, Recker RR, Grote J. Vitamin D₃ is more potent than Vitamin D₂ in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2011; 96: 447-425.

Hedhammar A, Wu F, Krook L, Schryver H, de Lahunta A, Whalen J, Kallfelz F, Nunez E, Hintz H, Sheffy B, Ryan G. Overnutrition and skeletal disease: An experimental study in growing Great Dane dogs. *The Cornell Veterinarian* 1974; 64(5): 9-160.

Heinemann KM, Waldron MK, Bigley KE, et al. Long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids are more efficient than alpha-linolenic acid in improving electroretinogram responses of puppies exposed during gestation, lactation, and weaning. *Journal of Nutrition* 2005; 135: 1960-1966.

Hoff-Jørgensen E. The influence of phytic acid on the absorption of calcium and phosphorus in dogs. *Biochemical Journal* 1946; 40(2): 189-192.

Holt RR, Uriu-Adams JY, Keen CL. Zinc. Teoksessa: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH. (toim.) *Present Knowledge in Nutrition*. 10. p. International Life Sciences Institute Wiley-Blackwell, Iowa, West Sussex, Oxford 2012: 521, 525-528, 532-533.

How KL, Hazewinkel HAW, Mol JA. Dietary vitamin D deficiency of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D. *General and Comparative Endocrinology* 1994; 96: 12-18.

Hunt C. Dietary boron: possible roles in human and animal physiology. *Biomedical Research on Trace Elements* 2008; 19(3): 243-253.

Hunziker EB, Kapfinger E, Geiss J. The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized process of tissue resorption and neoformation during postnatal development. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15(4): 403-413.

Hunziker EB, Schenk RK. Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *The Journal of Physiology* 1989; 414: 55-72.

Hunziker EB, Wagner J, Zapf J. Differential effects of insulin-like growth-factor-I and growth hormone on developmental stages of rat growth-plate chondrocytes in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 93: 1078-1086.

Huxtable RJ. The physiological actions of taurine. *Physiological reviews* 1992; 72: 101-163.

Ishikawa H, Omoe K, Endo A. Growth and differentiation schedule of mouse embryos obtained from delayed mating 1992; 45: 655-659.

Jenkins K, Phillips P. The mineral requirements of the dog. The relation of calcium, phosphorus and fat levels to minimal calcium and phosphorus requirements. Journal of the Nutrition 1960b; 70: 241-246.

Johnston CS. Vitamin C. Teoksessa: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH (toim.) Present Knowledge in Nutrition. 10. p. International Life Sciences Institute Wiley-Blackwell, Iowa, West Sussex, Oxford 2012: 248, 250-251.

Jugdaohsingh R. Silicon and bone health. The Journal of Nutrition Health and Aging 2007; 11(2): 99-110.

Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. Journal of Cellular Biochemistry 2003; 88(4): 660-672

Kalhan SC, Marczewski SE. Methionine, homocysteine, one carbon metabolism and fetal growth. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders 2012; 13(2): 109-119.

Kaminski M, Kaminski G, Jakobisiak M, Brzeninski W. Inhibition of lymphocyte-induced angiogenesis by isolated chondrocytes. Nature 1977; 268: 238-240.

Karthiga S, Dubey S., Garber S, Watts R. Scurvy: MRI appearances. Rheumatology 2008; 47(7): 1109.

Kealy RD, Lawler DF, Ballam JM, Mantz SL, Biery DN, Greeley EH, Lust G, Segre M, Smith GK, Stowe HD. Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 2002; 220(9): 1315–1320.

Kempe R, Leppänen M, Mäki K, Saastamoinen M, Särkijärvi S, Tiira K. Koira ruuansulatus; Koiran tarvitsemat ravintoaineet; Koiranruuan raaka-aineet ja sulavuus; Kantavan ja imettävän nartun ruokinta; Koiran ruokinnan suunnittelu. Teoksessa: Koiran ruokinta ja hoito. 2. p. Kariston Kirjapaino Oy, Hämeenlinna 2010: 5-8, 10, 17, 25, 27, 64, 65, 67, 68, 90, 92-94.

Kerrigan S, Robinson D. Juvenile Orthopedic Disease in Dogs & Cats. Part 2: Congenital & Neonatal Orthopedic Diseases. Today's Veterinary Practice - An Official Journal of the NAVC 2016; 6(5): 24-33.

Khanna C, Lund EM, Raffe M, Armstrong PJ. Hypomagnesemia in 188 dogs: a hospital population-based prevalence study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1998; 12(4): 304-309.

Kramer GA, Kittleson MD, Fox PR, Lewis J, Pion PD. Plasma taurine concentrations in normal dogs and dogs with dogshearth disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1995; 9: 253-258.

Krause M, Lehmann D, Amling M, et al. Intact bone vitality and increased accumulation of nonmineralized bone matrix in biopsy specimens of juvenile osteochondritis dissecans: a histological analysis. *American Journal of Sports Medicine* 2015; 43: 1337–1347.

Kronenberg HM. PTHrP and Skeletal Development. *Annals New York Academy on Sciences* 2006; 1068: 1-13.

Krontveit RI, Nødtvedt A, Sævik BK, Ropstad E, Trangerud C. Housing- and exercise-related risk factors associated with the development of hip dysplasia as determined by radiographic evaluation in a prospective cohort of Newfoundlands, Labrador Retrievers, Leonbergers, and Irish Wolfhounds in Norway. *American Journal of Veterinary Research* 2012; 73(6): 838-846.

Kugler JH, Tolinson A, Wagstaff A, Ward SM. The role of cartilage canals in the formation of secondary centres of ossification. *Journal of Anatomy* 1979; 129: 493-506.

Kustritz MV. Determining the optimal age for gonadectomy of dogs and cats - review. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2007; 231(11): 1665-1675.

LaFond E, Breur GJ, Austin CC. Breed susceptibility for developmental orthopedic diseases in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2002; 38: 467-477.

Land C, Schoenau E. Fetal and postnatal bone development: reviewing the role of mechanical stimuli and nutrition. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008; 22(1): 107–118.

Laverty S, Girard C. Pathogenesis of epiphyseal osteochondrosis - Review. *The Veterinary Journal* 2013; 197: 3-12.

Lazar MA, Birnbaum MJ. Physiology. De-meaning of metabolism. *Science* 2012; 336(6089): 1651-1652.

Leach RM Jr, Harris ED. Manganese. Teoksessa O'Dell BL, Sunde RA (toim.) Handbook of Nutritionally Essential Minerals. Marcel Dekker, New York 1997: 335-355.

Lee ER, Lamplugh L, Shepard NL, Mort JS. The septoclast, a cathepsin B-rich cell involved in the resorption of growth plate cartilage. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1995; 43: 525-536.

Leighton RL. Historical perspectives of osteochondrosis. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 1998; 28: 1-16.

Mackie EJ, Ahmed YA, Tataczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton - Review. *The International Journal of Biochemistry ja Cell Biology* 2008; 40: 46-62.

Mackie EJ, Tataczuch L, Mirams M. The Skeleton: a multi-functional complex organ. The growth plate chondrocyte and endochondral ossification - Thematic review. *Journal of Endocrinology* 2011; 211: 109-121.

Maehira F, Miyagi I, Eguchi Y. Effects of calcium sources and soluble silicate on bone metabolism and the related gene expression in mice. *Nutrition* 2009; 25(5): 581-589.

Maes C, Kobayashi T, Selig MK. Osteoblast precursors but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along invading blood vessels. *Developmental Cell* 2010; 19: 329-344.

Maier GS, Lazovic D, Maus U, Roth KE, Horas K, Seeger JB. Vitamin D deficiency: The missing etiological factor in the development of juvenile osteochondrosis dissecans? *Journal of Pediatric Orthopedics* 2016; 00: 1-4.

McCall KA, Huang C, Fierke CA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *Journal of Nutrition* 2000; 130: 1437S-1446S.

Mebarak S, Abousalham A, Magne D, Duy Do L, Bendorowicz-Pikula J, Pikula S, Buchet René. Phospholipases of mineralization competent cells and matrix vesicles: roles of physiological and pathological mineralizations - review. *International Journal of Molecular Sciences* 2013; 14: 5036-5129.

Meir H, Clark ST, Schnelle GB, Will DH. Hypertrophic osteodystrophy associated with disturbance of vitamin C synthesis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1957; 130: 483-491.

Michelsen J. Canine elbow dysplasia: Aetiopathogenesis and current treatment recommendations - Review. *The Veterinary Journal* 2013; 196: 12-19.

Milner JA. Assessment of indispensable and dispensable amino acids for the immature dog. *The Journal of nutrition* 1979a; 109: 1161-1167.

Milner JA. Assessment of the essentiality of methionine, threonine, tryptophan, histidine and isoleucine in immature dog. *The Journal of nutrition* 1979b; 109: 1351-1357.

Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physical role of estrogen. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995; 80: 3689-3698.

Morris JG. Ineffective vitamin D synthesis in cats is reversed by an inhibitor of 7-dehydrocholesterol- γ -7-reductase. *Journal of Nutrition* 1999; 129: 903-908.

Moss ML. The regulation of skeletal growth. Teoksessa: Goss RJ. *Regulation of Organ and Tissue Growth*. Academic Press, New York 1972b: 127-142.

Nandi A, Mukhopadhyay CK, Chosh MK, Chattopadhyay DJ, Chatterjee IB. Evolutionary significance of vitamin C biosynthesis in terrestrial vertebrates. *Free Radical Biology and Medicine* 1997; 22(6): 1047-1054.

Nap RC, Hazewinkel HAW, van den Brom WE. ^{45}Ca kinetics in growing miniature poodles challenged by four different dietary levels of calcium. *The Journal of Nutrition* 1993; 123(11): 1826-1833.

Nap RC, Hazewinkel HAW, Voorhout G, Van den Brom WE, Goedegebuure SA, Van 't Klooster AT. Growth and skeletal development in Great Dane pups fed different levels of protein intake. *Journal of Nutrition* 1991; 121(11): S107-S113.

Nap RC, Hazewinkel HAW. Growth and Skeletal Development in the Dog in Relation to Nutrition - Review. *Veterinary Quarterly* 1994; 16(1): 50-59.

Nielsen FH. Is boron nutritionally relevant? *Nutrition Reviews* 2008; 6(4): 183-191.

Nielsen FH. Manganese, molybdenum, boron, chromium, and other trace elements. Teoksessa: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH (toim.) *Present Knowledge in Nutrition*. 10. p. International Life Sciences Institute Wiley-Blackwell, Iowa, West Sussex, Oxford 2012: 586-588.

Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CB, Nexø E, Moestrup SK. Vitamin B12 transport from food to body's cells - a sophisticated, multistep pathway. *Nature Reviews Gastroenterology ja Hepatology* 2012; 9(6): 345-354.

Nilsson A, Isgaard J, Lindahl A, Danhlstrom A, Skottner A, Isaksson OGP. Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-1 in rat growth plate. *Science* 1986; 233:571-574.

Nir I, Shani J, Locker D, Sulman FG. Effect of light and pinealectomy on body weight and tibia cartilage of female rats. *Life Science* 1972; 11: 41-49.

Norman AW ja Henry HL. Vitamin D. Teoksessa: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH (toim.) *Present Knowledge in Nutrition*. 10. p. International Life Sciences Institute Wiley-Blackwell, Iowa, West Sussex, Oxford 2012: 199-201, 207-208.

NRC 2006. The National Research Council of the National Academies. *Feeding Behavior of Dogs and Cats; Energy; Protein and Amino Acids; Minerals; Vitamins; Physical Activity and Environment; Nutrient Requirements and Dietary Nutrient Concentrations*. Teoksessa: *Nutrient Requirements of Dogs and Cats*. The National Academies Press, Washington 2006: 24, 34-39, 112, 119-122, 129, 135, 146-150, 152-153, 156-158, 168, 171-173, 177-178, 184-185, 194-202, 225-226, 234-236, 303, 356.

Ohsugi K, Gardiner DM, Bryant SV. Cell cycle length affects gene expression and pattern formation in limbs. *Developmental Biology* 1997; 189: 13-21.

Olsson SE, Reiland S. The nature of osteochondrosis in animals. Summary and conclusions with comparative aspects on osteochondritis dissecans in man. *Acta Radiologica - Supplement* 1978; 358: 299-306.

Olstad K, Ekman S, Carlson CS. An Update on the Pathogenesis of Osteochondrosis - Review. *Veterinary Pathology* 2015; 52(2): 785-802.

Oury F, Khrimian L, Denny CA, Gardin A, Chamouni A, Goeden N, Huang Y, Lee H, Srinivas P, Gao XB, Suyama S, Langer T, Mann JJ, Horvath TL, Bonnin A, Karsenty G. Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions. *Cell* 2013; 155(1): 228-241.

Padgett GA, Mostosky UV, Probst CW, Thomas MW, Krecke CF. The inheritance of osteochondritis dissecans and fragmented coronoid process of the elbow joint in Labrador retrievers. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1995; 31: 327-330.

Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature* 1998; 392(6676): 559.

Prentice A, Schoenmakers I, Laskey MA, de Bono S, Fiona Ginty F, Goldberg GR. Symposium on 'Nutrition and health in children and adolescents' Session 1: Nutrition in growth and development: Nutrition and bone growth and development. *The Proceedings of the Nutrition Society* 2006; 65(4): 348-360.

Richardson DC, Toll PW: Relationship of nutrition to developmental skeletal disease in young dogs. *Veterinary Clinical Nutrition* 1997; 4: 6-13.

Richardson DC, Zentek J. Nutrition and osteochondrosis. *Veterinary clinics of North America: Small animal practice* 1998; 28(1): 115-135.

Romsos DR, Palmer HJ, Muiruri KL, et al. Influence of a low carbohydrate diet on performance of pregnant and lactating dogs. *Journal of Nutrition* 1981; 111: 678-689.

Ross MH, Wojciech P. Connective Tissue; Cartilage; Bone; Endocrine Organs. *Teoksessa: Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. 6. p. Wolters Kluwer Health - Lippincott Williams ja Wilkins, Philadelphia 2011: 165, 169, 173-178, 201, 203, 206-207, 209, 227, 235-239, 756.

Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirchn W, Moritz JD, Schu P, von Figura K. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosisi in cathepsin-K-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95: 13453-13458.

Schoenmakers I, Hazelwinkel HAW, van den Brom WE. Excessive Ca and P intake during early maturation in dogs alters Ca and P balance without long-term effects after dietary normalization. *The Journal of Nutrition* 1999; 129: 1068-1074.

Schoenmakers I, Hazewinkel HA, Voorhout G, Carlson CS, Richardson D. Effects of diets with different calcium and phosphorus contents on the skeletal development of growing Great Danes. *Veterinary Record* 2000; 147(23): 652–660.

Schwartz ER. Metabolic response during early stages of surgically-induced osteoarthritis in mature beagles. *Journal of Rheumatology* 1980; 7: 788-800.

Sêbek J, Skalova J, Hert J. Reaction of bone to mechanical Stimuli: Part 8. Local differences in structure and strength of periosteum. *Folia Morphologica* 1972; 20: 29-37.

Semevolos SA. Osteochondritis dissecans development – Review article. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 2017; 33: 367-378.

Sjaastad ØV, Sand O, Hove K. The Endocrine System; Bone Tissue and Mineral Metabolism; The Kidneys and the Urinary Tract; The Digestive System. Teoksessa: *Physiology of Domestic Animals*. 2. p. Scandinavian Veterinary Press, Oslo 2010: 235-236, 260-261, 265-266, 270-276, 489, 537, 610.

Salmeri KR, Bloomberg MS, Scruggs SL, et al. Gonadectomy in immature dogs: effects on skeletal, physical and behavioral development. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1991; 198: 1193–1203.

Slater M, Scarlett J, Donoghue S, Kaderly R, Bonnett B, Cockshutt J, Erb H. Diet and exercise as potential risk factors for osteochondritis dissecans in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1992; 53: 2119-2124.

Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *New England Journal Medicine* 1994; 33: 1056-1061.

Stabler SP. Vitamin B₁₂. Teoksessa: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH. (toim.) *Present Knowledge in Nutrition*. 10. p. International Life Sciences Institute Wiley-Blackwell, Iowa, West Sussex, Oxford 2012: 343.

Stahlman R, Kuhner M, Shakibaei M, Flores J, Vormann J, van Sickle D. Effects of magnesium deficiency on joint cartilage in immature Beagle dog: Immunohistochemistry, electron microscopy, and mineral concentrations. *Archives of Toxicology* 2000; 73: 573-580.

Stefanidou M, Maravelias C, Dona A, Spiliopoulou C. Zinc: a multipurpose trace element. *Archives of Toxicology* 2006; 80(1): 1-9.

Stevens DA, Hasserjian RP, Robson H, Siebler T, Shalet SM, Williams GR. Thyroid hormones regulate hypertrophic chondrocyte differentiation and expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor during endochondral bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research* 2000; 15(12): 2431-2442.

Stevenson S, Hunziker EB, Herrmann W, Schenk RK. Is longitudinal bone growth influenced by diurnal variation in the mitotic activity of chondrocytes of the growth plate? *Journal of Orthopaedic Research* 1990; 8: 132-135.

Trang H, Cole DE, Rubin LA ym. Evidence that Vitamin D₃ increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does Vitamin D₂. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1998; 68: 854-858.

Tryfonidou MA, Holl MS, Stevenhagen JJ, Buurman CJ, Deluca HF, Oosterlaken-Dijksterhuis MA, van den Brom WE, van Leeuwen JPTM, Hazelwinkel HAW. Dietary 135-fold cholecalciferol supplementation severely disturbs the endochondral ossification in growing dogs. *Domestic Animal Endocrinology* 2003; 24: 265-285.

Tuerk MJ, Fazel N. Zinc deficiency. *Current Opinion in Gastroenterology* 2009; 25(2): 136-143.

Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. Essentiality of Copper in Humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1998; 67: 952-959.

Vaillant C, Horadagoda NU, Batt RM. Cellular localization of intrinsic factor in pancreas and stomach of the dog. *Cell and Tissue Research* 1990; 260: 117-122.

van der Eerden BC, Kasperien M, Wit JM. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocrine Reviews* 2003; 24: 782-801.

van Weeren PR, Barneveld A. The effect of exercise on the distribution and manifestation of osteochondrotic lesions in the Warmblood foal. *Equine Veterinary Journal* 1999; 31: 16-25.

Weaver ICG, Cervoni N, Champagnel FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience* 2004; 7: 847-854.

Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98: 6871-6876.

Vitale A, LaTorre F, Martini G, Calcagno G, Fede C, Conti G, Chimenz R, Zulian F. Arthritis and gum bleeding in two children. *Journal of Paediatrics and Child Health* 2009; 45(3): 158-160.

Vitale JJ, Hellerstein EE, Nakamura M, Lown B. Effects of magnesium-deficient diet upon puppies. *Circulation Research* 1961; 9: 387-394.

Young HH, Milner JA, Corbin JE. Arginine requirements in immature dogs. *Journal of Nutrition* 1978; 108: 203-210.

Ytrehus B, Carlson CS, Ekman S. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis - Review. *Veterinary Pathology* 2007, 44(4): 429-448.

Zamboni G, Piemonte G, Bolner A, Antoniazzi F, Dall'Agnola A, Messner H, Gambaro G, Tato L. Influence of dietary taurine on vitamin D absorption. *Acta Paediatrica* 1993; 82: 811-815.

Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S, Olsen BR. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mechanism of Development* 2001; 106: 97-106.

Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 2004; 131: 2161-2171.

Zentek J, Meyer H. Investigations on copper deficiency in growing dogs. *The Journal of nutrition* 1991; 121: 83S-84S.